

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Surexpression de la leptine ovine dans Escherichia coli

MAURY, Virginie

*Award date:*  
2004

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

**Faculté des Sciences**

**Surexpression de la leptine ovine dans *Escherichia coli***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Virginie Maury  
Septembre 2004

Afin de faciliter la lecture de ce travail, voici une liste des abréviations utilisées :

Abréviations	Significations
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ac	Anticorps
AgRP	Agouti-related protein
ARN	Acide ribonucléique
ARN	ARN messenger
BCS	Body condition score
BMI	Body mass index
CART	peptide transcrit en réponse aux amphétamines et à la cocaïne
CIS	cytokine inducible SH2-containing protein
Db	Diabete
dNTP	déoxynucléotides tri-phosphates
DO	Densité optique
ds	double strand
ERK	Extracellular regulated kinase
FSH	Follicule stimulating hormone
GH	Growth hormone
GHRH	Growth hormone release hormone
GHRP	Growth hormone release peptides
GnRH	Gonadotrophin-releasing hormone
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
hCG	human chorionique gonadotrophin
His	Histidine

IL	Interleukine 6
IgG	Immunoglobulines G
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
IRS	Insulin receptor substrat
JAK	signal Janus kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
LB	Luria Broth: milieu liquide ou bouillon de culture bactérienne
LH	Luteinizing hormone
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCH	Melanin concentrating hormone
MC4R	Melanocortin 4 receptor
Ni-NTA	Ni <sup>2+</sup> – acide nitrilotriacétique
NPY	Neuropeptide Y
Ob	Obesity
Ob-RL	Long form of leptin (product of the Obese gene) receptor
Ob-R <sub>S</sub>	Short form of leptin (product of the Obese gene) receptor
PCR	Polymerase chain reaction
PCOS	Syndrome de l’ovaire polykystique
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PK	Protein kinase
POMC	Proopiomélanocortin
RT-PCR	Retrotranscription - polymerase chain reaction

SDS	Sodium dodécyle sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécyle sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
SHC	Src homology/collagen
SH2	Src homology 2 domain
SHP2	SH2 containing phosphatase
SIF	polymères de STAT
SMC	Site multiple de clonage
SOCS	Suppressor of cytokine signalling
ss	single strand
STAT	Activateur de transcription et signalling
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
UV	Ultra-violets

## **INTRODUCTION**

<b>1. Intérêts de la leptine .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Objectifs du travail.....</b>	<b>5</b>

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>1. Structure du gène et de la molécule de la leptine .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Récepteurs à la leptine et transduction du signal.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Formes courtes du récepteur de la leptine : Ob-RS .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Forme longue du récepteur de la leptine : OB-R<sub>L</sub> : OB-R<sub>b</sub>.....</b>	<b>8</b>
2.2.1. Activateurs de transcription : STAT (fig.6) .....	8
2.2.2. Substrat des récepteurs à insuline : IRS .....	8
2.2.3. Sous unité p85 de la phosphatidylinositol kinase : PI3 kinase .....	8
2.2.4. Protéine Src homology/collagen : SHC .....	9
2.2.5. Cytokine inducible SH2-containing protein : CIS .....	9
2.2.6. Suppressor of cytokine signalling : SOCS (fig. 6) .....	9
2.2.7. Conclusions : .....	9
<b>3. Effets de la leptine .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. La leptine et l'alimentation.....</b>	<b>10</b>
3.1.1. Comportement alimentaire .....	10
3.1.2. Métabolisme des lipides .....	11
3.1.3. Métabolisme des glucides .....	12
<b>3.2. La leptine et la reproduction .....</b>	<b>13</b>
3.2.1. Expérimentation .....	13
3.2.2. La leptine et les neurones à GnRH.....	14
3.2.4. La leptine et la stéroïdogénèse des gonades .....	15
3.2.5. La leptine et le cycle menstruel.....	16
3.2.7. La leptine et la lactation .....	17
<b>3.3. La leptine et le système immunitaire .....</b>	<b>17</b>
<b>3.4. La leptine et la régulation de la composition osseuse.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5. La leptine et la régulation de la pression sanguine .....</b>	<b>19</b>
<b>4. Facteurs influençant la production de leptine .....</b>	<b>19</b>
4.1. Le sexe du sujet.....	19
4.2. La masse graisseuse.....	20
4.3. Glucocorticoïdes .....	20
4.4. Insuline .....	20
4.5. Photopériode .....	20
<b>5. Pathologies liées à la leptine .....</b>	<b>21</b>
5.1. La leptine et le syndrome de l'ovaire polykystique (PCOS).....	21
5.2. La leptine et les désordres alimentaires .....	21
5.3. La leptine et l'aménorrhée .....	21
5.4. La leptine et les pathologies osseuses.....	22
<b>6. Production de leptine recombinante.....</b>	<b>22</b>
6.1. Choix de l'organisme de production.....	22
6.2. Choix du vecteur d'expression .....	23
6.3. Purification et mise en évidence de la leptine produite.....	23

## **MATERIEL ET METHODES**

<b>1. Extraction de l'ARN des cellules adipeuses .....</b>	<b>25</b>
1.1. Principe .....	25
1.2. Protocole.....	25
<b>2. Dosage des acides nucléiques.....</b>	<b>26</b>
2.1. Principe .....	26

2.2. Protocole.....	26
3. RT- PCR.....	26
3.1. Principe .....	26
3.2. Réactifs et solutions .....	26
3.3. Protocole.....	26
4. PCR diagnostique.....	27
5. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	27
5.1. Principe .....	27
5.2. Protocole.....	28
6. Purification et extraction des produits PCR après migration sur gel .....	28
6.1. Principe .....	28
6.2. Réactifs, solutions et matériel.....	28
6.3. Protocole.....	29
7. Réaction de ligation.....	29
7.1. Principe .....	29
7.2. Protocole.....	29
8. Transformation bactérienne.....	29
8.1. Principe (fig. 23) .....	29
8.2. Protocole.....	29
9. Minipréparation d'ADN plasmidique .....	30
9.1. Principe .....	30
9.2. Protocole.....	30
10. Restriction d'ADN.....	30
10.1. Principe .....	30
10.2. Protocole.....	30
11. Séquençage.....	31
Principe (fig. 24) .....	31
12. Purification de protéines taggées His .....	31
12.1. Principe .....	31
12.2. Protocole.....	32
13. Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) .....	32
13.1. Principe (fig. 26) .....	32
13.2. Protocole.....	32
14. Western Blot (transfert sur membrane de nitrocellulose).....	33
14.1. Principe (fig. 27) .....	33
14.2. Protocole.....	33
15. Immunodétection.....	33
15.1. Principe .....	33
15.2. Protocole.....	33
<b>RESULTATS</b>	
1. Synthèse des inserts et séquençage du gène de la leptine.....	35
1.1. Biopsie .....	35
1.2. Extraction d'ARN .....	35
1.3. Reverse Transcription.....	35
1.4. Synthèse des inserts.....	35
1.4.1. Choix des amorces .....	35
1.4.2. Amplification des fragments d'ADN .....	37
1.5. Clonage dans pGEMTeasy, transformation dans <i>E. coli</i> (DH10B) et séquençage du gène .....	38
1.5.1. Restriction du vecteur pGEMTeasy et ligation .....	38

1.5.2. Transformation des bactéries .....	39
1.5.3. Extraction de l'ADN plasmidique (minipréparation) et restriction diagnostique .....	40
<b>2. Clonage du gène OB en vue de son expression par <i>E. coli</i> (BL21) .....</b>	<b>40</b>
<b>2.1. Choix du vecteur.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2. Restriction enzymatique et ligation .....</b>	<b>42</b>
2.2.1. Restriction des inserts et du vecteur d'expression .....	42
2.2.2. Ligation .....	43
<b>2.3. Transformation.....</b>	<b>44</b>
2.3.1. Transformation des bactéries et mise en culture .....	44
2.3.2. Sélection des clones .....	44
<b>2.4. Séquençage .....</b>	<b>45</b>
<b>3. Culture, mise en évidence et purification des protéines .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Culture et mise en évidence de la leptine .....</b>	<b>46</b>
3.1.1. Culture des clones 1 et 2 .....	46
3.1.2. Vérification de l'expression de leptine.....	46
<b>3.2. Purification de la protéine taggée His .....</b>	<b>47</b>
3.2.1. Choix de la méthode de purification .....	47
3.2.2. Mise au point de la technique.....	48
<b>3.3. Caractérisation par Western Blot de la protéine purifiée .....</b>	<b>48</b>
<b>DISCUSSION, CONCLUSIONS, PERSPECTIVES</b>	
<b>1. Discussion .....</b>	<b>50</b>
<b>2. Perspectives.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	



## 1. Intérêts de la leptine

Dans nos pays dits développés, deux problèmes de santé publique tracassent particulièrement les citoyens, les médecins et les autorités politiques.

Il s'agit de l'obésité et de la stérilité.

Gura estimait en 1997 que les Etats-Unis dépensaient 30 milliards de dollars pour traiter l'obésité. Le cas des Etats-Unis peut toutefois être considéré comme extrême puisque Colditz, en 1992, nous rapportait déjà des statistiques alarmantes, nous révélant que plus de 30% de la population américaine souffrait d'obésité.

Depuis, l'Europe n'a pas été épargnée. En sont la preuve les nombreuses cliniques de l'alimentation et du traitement de l'obésité que l'on a pu voir fleurir en France comme en Belgique.

Plus qu'un problème d'insertion sociale ou d'esthétisme, l'obésité se caractérise par des problèmes de santé pouvant être graves tels que le cholestérol, l'insuffisance cardiaque, le diabète,...

L'obésité est donc au cœur de nombreuses études.

De plus, beaucoup de médecins et scientifiques observèrent une corrélation entre la fertilité et la masse corporelle.

En effet, des femmes dont le BMI (Body Mass Index) était en dessous de la normale étaient dans l'incapacité d'être fécondées mais voyaient leur taux d'ovulation et leur fécondité se rétablir lorsque leur BMI avait augmenté.

A l'inverse, il semble que la stérilité de nombreuses femmes soit due à leur excès de masse grasseuse, une diminution de leur BMI entraînant le retour de menstruations normales et régulières.

De même, le monde agricole affiche un grand intérêt pour cette protéine qui peut, à la fois, avoir une forte influence sur l'engraissement des bêtes et le taux de reproduction par tête de bétail. La leptine présente même un intérêt dans l'évaluation de la qualité de la viande (Hale *et al.*, 1998).

Aujourd'hui, le monde scientifique connaît l'importance de la leptine, tant pour son rôle dans le contrôle du BMI que pour son contrôle de la fertilité ou sa corrélation avec d'autres hormones à cible cérébrale. Malgré tout, les personnes dont l'obésité ou la stérilité sont liées à la leptine sont une faible minorité. En effet, les raisons de ces dérèglements sont le plus souvent liées à d'autres facteurs, génétiques ou non, le plus souvent environnementaux.

Par contre, on observe une plus forte corrélation entre la leptine et les anomalies pondérales ou reproductives des animaux. Ce phénomène s'explique par le fait que le régime alimentaire des animaux dépend uniquement de leurs besoins alimentaires et non de leur affinité pour certains aliments. C'est pourquoi les sciences vétérinaires montrent un intérêt particulier pour cette protéine.

Ainsi, le laboratoire de physiologie animale des FUNDP travaille depuis plusieurs années déjà sur les relations unissant le niveau nutritionnel, l'état corporel, la leptine et les processus de reproduction (Bister *et al.*, 2004 ; Mbayahaga *et al.*, 2004).

## 2. Objectifs du travail

Pour mener à bien ses projets de recherche, le laboratoire de Physiologie animale utilisait de la leptine ovine commercialisée par une société spécialisée. Cette molécule n'est plus disponible actuellement sur le marché.

Le thème de ce mémoire, à savoir isoler l'ARNm codant pour la leptine ovine afin de produire une protéine recombinante, est donc d'une grande importance pour la continuité des expériences menées ces dernières années par l'équipe du laboratoire de physiologie animale.

Le but de ces investigations est donc de produire, à des fins expérimentales, une leptine ovine recombinante pouvant être utilisée par les chercheurs du laboratoire de physiologie animale dans le cadre de leurs recherches.

Il nous faut établir un protocole rapide, simple et efficace de production de leptine afin d'en disposer lors de recherches *in vitro* ou *in vivo*. Nous avons donc réuni un maximum d'informations sur les différentes techniques utilisées pour la production et la purification de leptine.

Toutefois, le laboratoire précité ne disposant pas de tout le matériel requis pour la transfection et la production de protéines recombinantes, les expériences développées dans cet écrit ont été faites en collaboration avec l'URBM (Unité de recherche en Biologie Moléculaire) des Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix de Namur.

Cette leptine ovine recombinante devra être caractérisée au point de vue de sa structure mais aussi de son activité biologique.

Une fois validée, la protéine obtenue pourra être utilisée dans les différents travaux de recherche du laboratoire de physiologie animale : élaboration de courbes d'étalonnage pour le dosage de leptine plasmatique chez la brebis, stimulation de follicules ovins par la leptine, essais *in vivo*,...

Différentes cellules de production ont été envisagées.

Le premier intérêt se porta sur *Pichia pastoris*, une levure très utilisée dans la production de protéines recombinantes. Cet organisme aurait facilité la production de cette protéine, mais l'utilisation de *Pichia pastoris* s'est avérée irréalisable par manque de chercheurs qualifiés pour la formation d'un mémorant dans ces techniques et suite à des problèmes de brevets.

L'autre possibilité a été *Escherichia coli*, bactérie permettant une surexpression très importante de la molécule cible. Nous disposons d'une bibliographie étoffée (Varnerin *et al.*, 1998 ; Gertler *et al.*, 1998 ; Jeong *et al.*, 1999)) sur les techniques de production protéique dans cet organisme, ce qui nous permet de connaître les particularités des résultats obtenus avec la leptine. Ainsi, nous savons que près de 95% de la production doit être extraite des corps d'inclusion, vésicules intracellulaires qui se forment par précipitation de protéines surexprimées.

Le travail présenté ici s'articule donc comme suit : une présentation bibliographique de la leptine, une description des méthodes utilisées puis les résultats reprenant les différentes étapes de la production, depuis la synthèse des inserts d'ADN jusqu'à la purification de la protéine recombinante. Cet écrit se terminera par une discussion, des conclusions et des perspectives envisageables.

## 1. Structure du gène et de la molécule de la leptine

La protéine codée par le gène de l'obésité fut isolée en 1994 et baptisée « leptine ».

La structure de la leptine la classe dans la famille des cytokines, ce qui suppose qu'elle agirait de façon similaire (Madej *et al.*, 1995).

Tous les membres de cette famille présentent une conformation de 4 hélices  $\alpha$  et deux longs loops de connection reliant les hélices A et B ainsi que les hélices C et D. Les hélices B et C sont connectées via un loop de type court (fig. 1). Cette structure fut mise en évidence par des analyses de séquence (Madej *et al.*, 1995), les techniques de résonance magnétique (Kline *et al.*, 1997) et l'étude de la structure cristalline de la leptine humaine (Zhang *et al.*, 1997).

La séquence protéique de la leptine est très bien conservée : la séquence ovine présente 96% d'homologie avec la leptine bovine, 93% avec la séquence porcine (Ramsay *et al.*, 1998), 84% avec la séquence murine, 82% avec la séquence du rat ; 80% avec la séquence du poulet (Taouis *et al.*, 2001) et 88% avec la séquence protéique humaine (Chilliard *et al.*, 1998 in Taouis *et al.*, 2001). Les séquences ADN chez le chat (Sasaki *et al.*, 2001) et le buffle d'eau égyptien (Sayed *et al.*, 2003) présentent également de nombreuses analogies avec la séquence ovine.

Le gène codant pour la leptine fut localisé chez plusieurs espèces. Chez l'Homme, le gène Ob, contenant une ORF d'environ 440 paires de bases (Isse *et al.*, 1995), est localisé sur le chromosome 7q31.3 (fig.2), contient trois exons séparés par deux introns et encode un ARNm de 4,5Kb. La leptine humaine produite est de 16KD et est composée de 146 acides aminés. Chez la souris, le gène est localisé sur le chromosome 6 et l'ARNm qui en découle est de 4,5Kb (Zhang *et al.*, 1994 in Brann *et al.*, 2002). Chez le bovin, le gène se trouve sur le chromosome 4 et encode un ARNm de 3,1Kb (Ji *et al.*, 1998). Chez l'ovin, qui nous intéresse particulièrement dans cette étude, l'ARNm est de 4,1 à 4,5Kb (Chilliard *et al.*, 1999).

## 2. Récepteurs à la leptine et transduction du signal

Les mutations dites ob/ob et db/db furent les plus étudiées des mutations génétiques causant l'obésité.

Ces deux mutations concernent en fait des gènes différents : le gène Ob codant pour la protéine de régulation alimentaire, la leptine, et un gène codant pour les récepteurs membranaires et solubles de la leptine, les Ob-R (Ingalls *et al.*, 1950 ; Hummel *et al.*, 1966). Un apport extérieur en leptine diminue visiblement l'obésité de souris ob/ob mais n'amène aucune amélioration chez les souris db/db (Coleman *et al.*, 1973). Une mutation du gène Db ne supprime ni ne diminue la production de leptine mais rend bien l'individu insensible à celle-ci, puisque ce gène code pour les récepteurs à la leptine et pas pour la protéine elle-même. Donc, l'individu devient insensible à la leptine.

Des molécules « taggées » de leptine furent utilisées pour mettre en évidence les tissus dont les cellules exprimaient en surface des récepteurs spécifiques à la leptine. Des cellules furent transfectées avec les banques d'ADN des cellules capables de lier la leptine à leur surface. Seules les cellules transfectées exprimant le récepteur de la leptine furent conservées. Le séquençage de l'ADN murin contenu dans ces cellules clonées révéla l'existence d'un récepteur de la famille gp130 des récepteurs aux cytokines de classe I (Tartaglia, 1997).

Cette observation corroborait l'hypothèse selon laquelle la leptine serait apparentée à la famille des cytokines.

Le récepteur Ob-R possède un domaine extracellulaire d'environ 816 acides aminés et un domaine intracellulaire pouvant être composé de 34 ou 303 acides aminés (Chen *et al.*, 1996). Plusieurs isoformes du récepteur ont été identifiées, chacune possédant un domaine intracellulaire de longueur particulière (Lee *et al.*, 1996 ; Caprio *et al.*, 1999 ; 2001). Dans le type sauvage, on observe au moins 5 épissages de l'ARNm produisant des récepteurs munis de domaines intracellulaires de longueurs variables : Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Re (Caprio *et al.*, 2001). De plus, de nombreux polymorphes de ces récepteurs ont été détectés (Thompson *et al.*, 1997).

On distingue deux familles de récepteurs à la leptine : les Ob-R<sub>L</sub> qui ont un domaine intracellulaire long et les Ob-R<sub>S(1-n)</sub> qui ont un domaine intracellulaire court (fig.3). L'existence d'un récepteur soluble n'étant pas muni de domaine intracellulaire a aussi été décrite (Lee *et al.*, 1996).

Le séquençage du gène Db démontra que les souris db/db présentaient en fait une mutation (Tartaglia, 1997). Cette mutation consiste en une substitution (G→T) au sein de l'exon codant l'extrémité C-terminale de la région intracellulaire de Ob-R<sub>L</sub>. Cette mutation engendre un nouveau site de splicing, créant ainsi un exon non approprié dans le transcrit codant le domaine extracellulaire de Ob-R. On obtient un récepteur avec un domaine extracellulaire trop long et un domaine intracellulaire tronqué. Le phénotype des souris db/db étant semblable à celui des souris ob/ob, on peut en conclure que, sans la forme Ob-R<sub>L</sub> du récepteur, la leptine ne peut plus tenir son rôle d'adipostat.

### **2.1. Formes courtes du récepteur de la leptine : Ob-RS**

Ob-Re se distingue des autres isoformes de Ob-Rs: Ob-Ra, Ob-Rc et Ob-Rd sont des récepteurs membranaires tandis que Ob-Re est soluble. D'un point de vue moléculaire, Ob-Re se différencie à partir du résidu His796. La séquence protéique est alors différente, plus longue de 9 acides aminés. Il semblerait que cette isoforme soit soluble (Caprio *et al.*, 2001).

Les récepteurs OB-Rs sont observables en grandes quantités au niveau du plexus choroïde (Tartaglia *et al.*, 1995 ; Banks *et al.*, 1996 in Harvey et Ashford, 2003). Ces récepteurs ont pour rôle le transport de la leptine du sang vers le liquide cébrospinal. En effet, on retrouve une grande quantité de Ob-Ra dans les cellules endothéliales du cerveau et les Ob-Rc se retrouvent dans les microvaisseaux cérébraux et dans le plexus choroïde (Hileman *et al.*, 2002 ; Kurrimbux *et al.*, 2004). Une fois dans le cerveau, la protéine pourrait diffuser vers les centres de régulation alimentaire selon un mécanisme de transport saturable grâce aux OB-Re, également de type court (Banks *et al.*, 1996 in White et Tartaglia, 1996). Cette hypothèse doit toutefois être confirmée par des études plus approfondies (Yamashita *et al.*, 1998 ; Zaho *et al.*, 2000 ; Harvey et Ashford, 2003, Bjorbaek *et al.*, 1997).

L'insensibilité à la leptine peut être perçue selon deux angles différents : soit la mutation du gène Db induit la production de Ob-Rs inefficaces dans le transport de la leptine jusqu'au cerveau, soit l'obésité n'est pas liée à une mutation de ce gène mais à une surexpression de leptine et dans ce cas, les récepteurs vont transporter la protéine jusqu'à saturation du mécanisme de transport. Ce dernier phénomène a déjà été observé chez des individus obèses dont la concentration en leptine dans le système nerveux central était normale mais dont les

concentrations plasmatiques atteignaient des valeurs anormalement élevées (Burguera et Couce, 2001).

Il a été observé que les différentes formes de Ob-Rs étaient distribuées dans des tissus spécifiques. La forme des récepteurs à domaine intracellulaire court détermine donc à la fois leur tissu de production mais aussi leur rôle (Lee *et al.*, 1996 ; Tartaglia, 1997).

## **2.2. Forme longue du récepteur de la leptine : OB-R<sub>L</sub> : OB-Rb**

Seul Ob-Rb (aussi nommé Ob-R<sub>L</sub>) est muni des motifs protéiques Box1 et Box2 qui sont caractéristiques des récepteurs de cytokines de classe I. Les motifs Box1 et Box2 activent les kinases JAK (signal Janus Kinase) et les activateurs de transcription STAT (Bates et Myers, 2003).

L'activation de la chaîne de transduction du signal se fait lorsque deux molécules de leptine viennent se lier à deux récepteurs OB-R<sub>L</sub> et que ces récepteurs dimérisent (fig.4).

Les protéines JAK sont associées à des régions précises du domaine intracellulaire du récepteur OB-Rb. Lors de la fixation de la leptine au domaine extracellulaire du récepteur, les kinases JAK phosphorylent le domaine intracellulaire qui apporte alors un site de fixation pour différents facteurs (fig.5).

La localisation des récepteurs Ob-Rb se fait principalement au niveau de l'estomac, (voir synthèse des triglycérides, métabolisme), des adipocytes (autorégulation) et de l'hypothalamus (satiété).

### **2.2.1. Activateurs de transcription : STAT (fig.6)**

Les JAK activent un site de liaison pour les protéines STAT qui vont se lier à Ob-R. Ob-Rb entraîne donc l'activation des STAT qui vont former des dimères actifs (SIF) (Baumann *et al.*, 1996). Les SIF peuvent être des homo- ou des hétéro-dimères qui se forment par interaction du domaine SH2 (domaine d'interaction avec les phosphotyrosines) d'un STAT avec un résidu phosphotyrosine C-terminal de l'autre (Kile *et al.*, 2002). Les STAT activées vont alors se diriger vers le noyau afin d'y stimuler la transcription de gènes dépendants des cytokines.

### **2.2.2. Substrat des récepteurs à insuline : IRS**

Ces molécules de signaling intracellulaire ont été ainsi dénommées car on pensait qu'elles n'étaient phosphorylées que par les récepteurs à l'insuline activés par liaison à leur substrat (Bates et Myers, 2003). On sait aujourd'hui que des récepteurs à cytokines sont aussi capables de phosphoryler les IRS. Une fois ses résidus tyrosine phosphorylés, l'IRS devient capable de lier des protéines SH2 et de les activer (Szanto et Kahn, 1999).

Des souris génétiquement invalidées pour le gène codant pour IRS présentent un phénotype de type db/db et développent donc une résistance à la leptine (Whiters *et al.*, 1998 ; Bates et Myers, 2003).

Nous reparlerons des IRS dans le chapitre traitant de la relation entre l'insuline et la leptine.

### **2.2.3. Sous unité p85 de la phosphatidylinositol kinase : PI3 kinase**

La PI3 kinase (PI3K) est activée en se liant au domaine intracellulaire phosphorylé de Ob-R. Son rôle est d'ajouter un phosphate en position 3' du cycle inositol des phosphatidylinositols. Les produits obtenus stimulent d'autres protéines kinases comme PKB et PKC (Sweeney, 2002).

L'un des buts de cette interaction entre la leptine et PI3K serait de jouer sur l'ouverture des canaux à potassium dans les cellules productrices d'insuline. En effet, les inhibiteurs de PI3K diminuent la capacité de la leptine d'influer sur l'insuline (Harvey *et al.*, 2000 ; Sweeney, 2002).

Notons que ces mécanismes peuvent parfois utiliser les IRS (Szanto et Kahn, 1999).

#### **2.2.4. Protéine Src homology/collagen : SHC**

Une région spécifique de cette protéine servira, une fois phosphorylée, de site de liaison pour SHP2 (SH2-containing phosphatase, tyrosine phosphatase) qui, phosphorylée à son tour, agit comme une molécule adaptatrice pour recruter Grb2 et Sos.

L'ensemble SHP2-Grb2 contrôle ensuite l'activation de ERK (extracellular regulated kinase). ERK va alors activer la transcription de divers gènes cibles tel c-fos. De même, la liaison de SHP2 à Ob-R entraîne l'activation des facteurs p38 et JNK.

La liaison de la leptine à son récepteur joue donc un rôle essentiel dans l'activation de la voie des MAPK (mitogen activated protein kinase) puisque l'activation et donc la dimérisation de ses récepteurs entraîne l'activation de nombreuses molécules de signalling intracellulaire faisant partie de la famille des MAPK (Sweeney, 2002).

#### **2.2.5. Cytokine inducible SH2-containing protein : CIS**

CIS a pour rôle le contrôle négatif du signaling de la leptine. Notons que cette molécule fait partie de la même famille que les SOCS (suppressor of cytokine signalling) dont nous parlerons plus tard, mais que son mode opératoire est différent.

CIS se lie directement aux sites phosphorylés du domaine intracellulaire du récepteur de la leptine dans le but d'empêcher la liaison de nouvelles STAT à ces sites phosphorylés des Ob-R et donc leur activation (Bjorbaek *et al.*, 1999).

#### **2.2.6. Suppressor of cytokine signalling : SOCS (fig. 6)**

Nous avons vu plus haut que les STAT sont des activateurs de transcription de gènes qui sont activés par la liaison de la leptine à son récepteur.

Il existe plusieurs systèmes de contrôle négatif des STAT: des phosphatases qui déphosphorylent les JAK et les Ob-R, des inhibiteurs protéiques des STAT et des suppresseurs de signalling cytokinaire. Ces derniers sont appelés SOCS.

Les SOCS1 ont un domaine central SH2 et présentent une homologie de structure importante avec CIS. De plus, CIS et SOCS ont une séquence C-terminale similaire de 40 acides aminés communs. Cette séquence est appelée SOCS box (Kile *et al.*, 2002).

La transcription des gènes de SOCS est activée par les STAT. Ce sont donc les STAT qui, par leur propre activité, vont réguler négativement leur production.

#### **2.2.7. Conclusions :**

Nous venons donc de survoler les différents mécanismes d'action de Ob-Rb dans la transduction du signal (fig.7).

Des expériences ont aussi démontré que le domaine intracellulaire de Ob-Rb contenait 2 régions capables de générer un phénomène de signaling intracellulaire. Un mutant délété de ses 50 acides aminés C-terminaux perd sa capacité de stimulation de la transduction du signal selon un mécanisme de type récepteur à cytokines. Pourtant, ce récepteur muté peut encore agir de la même manière qu'un récepteur hématopoïétique (Bjorbaek *et al.*, 1997 ; Tartaglia, 1997).

La structure native de Ob-Rb lui donne donc plusieurs usages, selon la présence ou non de régions d'activation dispersées le long de son domaine intracellulaire (White *et al.*, 1997 ; Tartaglia, 1997).

Ces études nous permettent de conclure que le récepteur de la leptine permet au tissu adipeux de communiquer avec le système nerveux central en plus de permettre à la leptine d'agir directement sur la lipogenèse ou la concentration en insuline par exemple (White et Tartaglia, 1996).

### 3. Effets de la leptine

Si la leptine a intéressé les chercheurs dans le cadre de l'obésité et donc la régulation de l'appétit (Kennedy *et al.*, 1953 ; Ahima et Flier, 2000), nous savons aujourd'hui qu'elle est à l'origine de mécanismes variés.

Le gène de l'obésité agit par exemple sur la reproduction ou encore l'appétit (fig. 8).

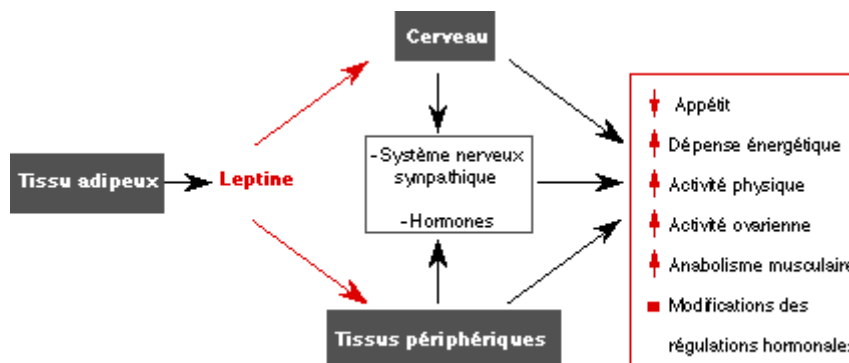


Figure 8 : Rôles multiples de la leptine (Chilliard *et al.*, 1999).

#### 3.1. La leptine et l'alimentation

##### 3.1.1. Comportement alimentaire

Des mécano- et chémorécepteurs du tractus gastro-intestinal captent la présence et la densité énergétique d'aliments ingérés et provoquent la satiété directe. Les signaux provenant de ces récepteurs du tractus gastro-intestinal sont transmis au cerveau par des nerfs afférents vagues. Il existe également des neurones de l'hypothalamus qui répondent à la concentration en glucose circulant et provoquent ainsi une sensation de faim ou de satiété selon les cas (Havel, 2001). Ces mécanismes provoquent une régulation de l'appétit à court terme.

La leptine, elle, va moduler la production de neuropeptides ayant la capacité de réguler le comportement alimentaire. Il s'agit alors de régulation du comportement alimentaire à long terme (Havel, 2001).

Depuis longtemps, les scientifiques savent que des injections de leptine chez l'homme ou chez l'animal provoquent une forte diminution de l'appétit et même un amaigrissement chez les sujets obèses présentant une mutation du gène Ob. Par contre, lorsque les sujets présentent une mutation Db, ils sont résistants à l'action de la leptine.

La leptine, produite par les adipocytes, va traverser la barrière hémato-encéphalique afin de se fixer à des Ob-Rb au niveau de l'hypothalamus. La liaison de cette hormone satiétogène (qui diminue la sensation de faim) va contrôler la production d'hormones efférentes (sécrétées par les neurones) diverses (NPY, AgRP, MCH, POMC, CART,...) (Havel, 2001).

La leptine interagit d'une part avec des neurones anaboliques qui produisent des neuropeptides à activité orexigène (qui augmentent la sensation de faim) tels le neuropeptide Y (NPY).

La sécrétion du neuropeptide Y est inhibée par la leptine. La quantité de NPY est donc diminuée et on observe une diminution de l'appétit.

En effet, il a été observé que la quantité d'ARNm de NPY est inversement proportionnelle à celle de l'ARNm de la leptine (Stephens *et al.*, 1996 ; Baskin *et al.*, 1999).

Notons que le NPY, en plus de stimuler la prise alimentaire, diminue la thermogenèse et augmente l'insulinémie et la cortisolémie. Tous ces effets sont donc inhibés par la leptine.

Le NPY, stimulateur de l'appétit, est sécrété au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus. Or, on retrouve une forte concentration de récepteurs Ob-Rb au niveau de l'hypothalamus, ce qui tend à confirmer l'hypothèse selon laquelle la leptine exercerait une activité à ce niveau (Tartaglia, 1997).

Afin de mettre en évidence la présence de ces récepteurs à proximité des neurones à NPY, des anticorps spécifiques ont été utilisés contre Ob-Rb. Ces anticorps se fixent aux Ob-Rb et l'ARNm du NPY est mis en évidence par FISH (Baskin *et al.*, 1999). La superposition des images obtenues prouve la co-localisation des récepteurs à la leptine et de l'ARNm du NPY (fig. 9).

En 1997, Dyer *et al.* ont cloné le gène de la leptine ainsi que les gènes des récepteurs NPY1 et NPY2 et ont étudié leur localisation dans les adipocytes. Les résultats obtenus ont soulevé une hypothèse selon laquelle le NPY exercerait un feedback négatif sur l'expression de la leptine.

Les neurones du noyau arqué sont donc des cibles de l'action de la leptine et agissent de façon rétroactive avec les adipocytes (fig. 10).

D'autres part, des neurones cataboliques produisent des peptides à activité anorexigène tels la proopiomélanocortine (POMC), la mélanine concentrating hormone ( $\alpha$ -MCH) et le peptide transcrit en réponse aux amphétamines et à la cocaïne (CART) (McMinn *et al.*, 2000).

Les études menées ont démontré une favorisation de la production de ces molécules par la leptine, ce qui entraîne une diminution de la sensation de faim (Schwartz *et al.*, 1996).

### **3.1.2. Métabolisme des lipides**

Le métabolisme des graisses dépend des besoins du corps en énergie et est régulé par la nutrition et les signaux neuronaux et hormonaux (Ahima et Flier, 2000). Les protéines sécrétées par le tissu adipeux interviennent de façon active dans le maintien de l'homéostasie énergétique et la régulation des fonctions immunes, neuroendocrines et autonomes.



La leptine fait partie de ces protéines sécrétées par le tissu adipeux et cumule diverses fonctions. En effet, des individus déficients en leptine ou insensibles à son activité présentent une forte hyperphagie, de l'obésité et des dysfonctionnements neuronaux et immunologiques.

La forme longue du récepteur de la leptine, si elle s'exprime le plus souvent au niveau de l'hypothalamus, se retrouve également en membrane des adipocytes, ce qui laisse à penser que la leptine exerce un rôle sur les cellules de stockage des graisses (Houseknecht *et al.*, 1998 ; Newby *et al.*, 2000).

Lorsque la production de leptine augmente, il y a diminution de la quantité de nutriments disponibles pour les tissus adipeux, diminution de la lipogenèse (synthèse des triglycérides et des acides gras qui les constituent), augmentation de la lipolyse et inhibition de la production de leptine (Chilliard *et al.*, 1999) (fig. 11). La leptine module l'équilibre énergétique par son effet sur l'appétit et les dépenses énergétiques et agit comme inhibiteur rétroactif indirect de la synthèse des triglycérides dans les adipocytes. Ainsi, elle diminue l'effet positif de l'insuline sur la captation du glucose et diminue donc la synthèse des triglycérides (fig. 12).

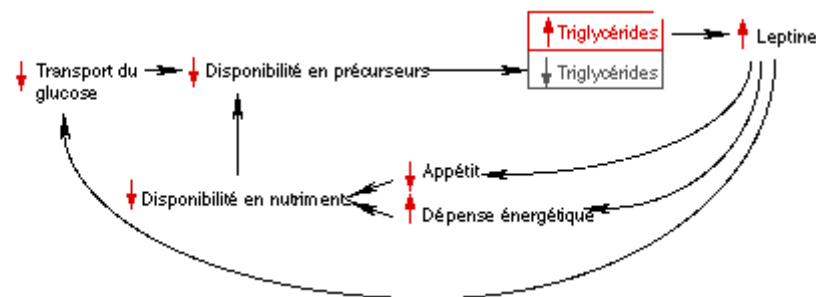


Figure 12 : Actions de la leptine sur la synthèse des triglycérides. (Vernon *et al.*, 1999).

L'augmentation du taux de leptine entraîne donc l'oxydation des acides gras et une diminution de la quantité de tissu adipeux (Coleman *et al.*, 1978 ; Friedman et Halaas, 1998).

### 3.1.3. Métabolisme des glucides

Les sujets présentant une mutation ob/ob, quelle que soit leur espèce, souffrent de diabète. L'injection de leptine augmente le catabolisme du glucose sans affecter la quantité d'insuline circulante puisque, comme nous l'avons dit plus haut, elle inhibe l'action de l'insuline sur la mobilisation du glucose. La leptine peut donc être associée au diabète insulinoindépendant (Shimomura *et al.*, 1999 ; Iwai *et al.*, 2003).

Un mauvais équilibre alimentaire entraîne l'obésité et donc une accumulation graisseuse au niveau des viscères. Ce surplus de poids s'accompagne d'une augmentation de la production de leptine qui va modifier la sensibilité de l'individu à l'insuline.

De nombreux articles ont traité du rôle de l'insuline dans le contrôle du comportement alimentaire. Cette régulation se ferait en relation avec les neurones orexigènes et anorexigènes. Comme nous l'avons déjà souligné, les mécanismes d'action de l'insuline et de la leptine présentent des similitudes et s'influencent mutuellement (Carvalho *et al.*, 2001 ; Gerozissis, 2004). En effet, nous avons vu plus haut que le signalling intracellulaire de la leptine utilise parfois l'activation des IRS (Insulin Receptor Substrate) ainsi que le système

enzymatique PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase) (Saltiel *et al.*, 2001 ; Gerozissis, 2004). Or, l'activité de l'insuline passe également par ces voies (fig. 13).

L'administration en intraveineux d'acides gras à des individus entraîne l'activation de canaux ioniques de la même manière que l'insuline ou la leptine, signale directement le statut alimentaire de l'organisme à l'hypothalamus, et altère la production de glucose au niveau du foie (Clement *et al.*, 2002).

Les canaux sur lesquels la leptine et l'insuline exercent leur activité permettent donc une régulation du comportement alimentaire en fonction de la quantité de nutriments disponible.

L'équilibre alimentaire influence donc la quantité d'insuline transportée activement vers l'hypothalamus. Par conséquent, il n'y a pas augmentation ou diminution du taux d'insuline par la leptine, mais bien une modulation de la sensibilité à l'insuline.

### **3.2. La leptine et la reproduction**

On sait depuis longtemps que la maturité sexuelle chez les mammifères dépend des conditions nutritionnelles et donc de la proportion de graisse et de sa répartition. En effet, une carence alimentaire entraîne un retard de la puberté chez l'Homme, et nombreux sont les cas de femmes obèses ou trop maigres souffrant d'infertilité.

Les premières observations furent faites chez le modèle murin. Des injections de leptine à des femelles et des mâles ob/ob restaurèrent leur capacité de reproduction (Chehab *et al.*, 1996 ; Mounzih *et al.*, 1997 ; Caprio *et al.*, 2001). L'injection de leptine n'eut aucune influence sur les souris db/db qui y sont insensibles.

La forme longue du récepteur à la leptine a été localisée au niveau du noyau arqué et du noyau ventromédian de l'hypothalamus, là où se trouve le centre de contrôle alimentaire mais également celui de contrôle du comportement sexuel. De plus, on localise des Ob-R dans les ovaires, l'endomètre et les testicules.

Les récepteurs à la leptine sont donc bien situés pour faire le lien entre l'état énergétique du corps et sa capacité de reproduction. Un organisme en déséquilibre énergétique sera dans des conditions défavorables pour la reproduction, l'énergie devant être économisée pour la survie de l'individu.

#### **3.2.1. Expérimentation**

L'injection de leptine à des souris souffrant de malnutrition restaure l'ovulation chez les femelles et la production de spermatozoïdes efficaces chez les mâles (Ahima *et al.*, 1996 ; Caprio *et al.*, 2001). Dans d'autres études, l'injection intraveineuse de leptine à des primates soumis au jeûne restaura la production de LH (Luteinizing Hormone), prouvant la capacité de la leptine à contourner l'inhibition de la sécrétion des gonadotropines due au jeûne (Finn *et al.*, 1998). A l'inverse, l'injection d'antisérum de la leptine dans le but de simuler le jeûne entraîne l'inhibition de la production d'hormones sexuelles et donc la cessation immédiate du cycle oestral (Pinilla *et al.*, 1999 ; Caprio *et al.*, 2001).

Les performances de reproduction des brebis varient avec la richesse de l'alimentation procurée deux à trois mois avant la saillie et durant les six semaines qui suivent (Paquay *et al.*, 2004).

L'étape suivante a été de vérifier l'existence d'une corrélation entre la masse corporelle des animaux et le taux de leptine dans le plasma (Wergifosse *et al.*, 2004a). La concentration en

leptine est liée positivement à la richesse du régime alimentaire. De plus, le taux de leptine augmente plus lorsque l'animal grossit que lorsqu'il est gras mais stable (Bister *et al.*, 2004a). Le laboratoire a alors voulu déterminer l'influence de la leptine sur l'efficacité reproductive. En plus de mesurer le taux plasmatique de leptine en fonction de l'alimentation, l'équipe a procédé à des laparoscopies afin d'estimer le taux d'ovulation (Wergifosse *et al.*, 2004b). Toutes les mesures et observations confirment l'importance du niveau alimentaire et de l'état corporel (BCS, Body Condition Score) sur la synthèse et les taux sanguins de la leptine et sur les performances de reproduction (Bister *et al.*, 2004b).

De même, des expériences menées sur de jeunes souris ob/ob ont permis d'accélérer l'apparition de la puberté par de multiples injections de leptine (Ahima *et al.*, 1997).

Notons toutefois que le traitement par injections de leptine à des femmes anorexiques ne suffit pas à rétablir les menstruations et l'activité ovarienne : un seuil minimal de leptine est nécessaire au bon fonctionnement des organes de reproduction mais n'est pas suffisant (Mantzoros *et al.*, 1997).

### **3.2.2. La leptine et les neurones à GnRH**

Des expériences *in vitro* ont démontré des effets variables de la leptine sur la production de GnRH : l'exposition de neurones produisant la GnRH à de faibles quantités de leptine (de l'ordre de 10nM) active la sécrétion, tandis que l'exposition à des quantités plus élevées (de l'ordre de 10μM) l'inhibe (Magni *et al.*, 1999 ; Caprio *et al.*, 2001).

On pense donc que la leptine facilite la sécrétion de GnRH indirectement, agissant sur des interneurons sécrétant des neuropeptides qui régulent la transcription de neuropeptides en réponse à la stimulation par la cocaïne et les amphétamines (Parent *et al.*, 2000 ; Moschos *et al.*, 2002) (fig. 14).

Ces données concordent avec le fait que l'anorexie et l'obésité provoquent toutes deux la stérilité chez la femme. Il faut que le taux de leptine se situe dans une certaine fourchette reflétant l'équilibre énergétique idéal du corps.

Notons que le NPY est suspecté d'avoir une influence sur la sécrétion de GnRH, or nous avons vu que la leptine agit sur ce peptide.

Des études immunohistochimiques ont démontré la présence de Ob-R dans la région antérieure de l'hypophyse chez l'ovine (Iqbal *et al.*, 2000 in Caprio *et al.*, 2001). L'incubation d'hypophyses murines dans de la leptine provoque une sécrétion dose dépendante de gonadotropines (Yu *et al.*, 1997). De plus, de hautes concentrations de leptine inhibent la prolifération des cellules hypophysaires (Jin *et al.*, 2000).

Bien que les premières études menées sur les follicules tendent à prouver un effet négatif de la leptine sur la production d'oestradiol, de très faibles doses de leptine semblent avoir l'effet inverse puisqu'on observe alors une augmentation de FSH (Follicule Stimulating Hormone) et de LH (Yu *et al.*, 1997).

Yu *et al.* (1997) ont également augmenté la production de LH et FSH en incubant l'hypophyse antérieure de rats dans de la leptine.

Par conséquent, la leptine influence positivement et directement les actions de stimulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades et régule la croissance et la différenciation des cellules hypophysaires (Caprio *et al.*, 2001).

### 3.2.3. La leptine et la puberté

Dans toutes les espèces, il est dans l'intérêt de la régulation de la population que la reproduction se fasse en tenant compte de facteurs génétiques mais aussi environnementaux comme le territoire, la densité de population et bien sûr la quantité de nourriture disponible.

Comme nous en avons déjà parlé, l'anorexie, la malnutrition et l'obésité retardent la puberté. En effet, la puberté chez les mammifères femelles ne commence que lorsque le corps présente un minimum de réserves graisseuses. C'est pourquoi on observe très souvent un retard en cas de sous-alimentation ou chez les jeunes sportives de haut niveau.

On observe une augmentation de la leptinémie chez les filles comme chez les garçons à partir de 5 ans. La figure 15 montre que le taux de leptine est toujours plus faible chez les garçons, et l'augmentation ne persiste après la puberté que chez les filles (Spicer *et al.*, 2001). Ce dimorphisme sexuel des concentrations de leptine est encore plus flagrant après la puberté puisque chez les garçons, la concentration diminue très vite après la puberté et chez les filles, elle se maintient tout au long du développement pubertaire (Caprio *et al.*, 2001). De plus, la capacité de liaison de la leptine à ses récepteurs est basse à la naissance, atteint un pic à la puberté puis redescend après la maturité sexuelle, ce qui augmente la quantité de leptine libre et donc son activité chez les individus matures (Moschos *et al.*, 2002).

On remarque qu'après la puberté, le volume des testicules et le taux de testostérone chez les mâles sont inversement proportionnels à la leptinémie, tandis que la quantité d'oestradiol chez les femelles est proportionnelle à la leptinémie (Isidori *et al.*, 2000).

Comme nous l'avons déjà dit plus haut, les androgènes et oestrogènes peuvent donc être à l'origine de la variation des concentrations en leptine entre mâles et femelles.

### 3.2.4. La leptine et la stéroïdogenèse des gonades

Des récepteurs à la leptine sont exprimés au niveau des testicules et permettent le passage de la leptine du sang vers les cellules spermatiques et les cellules de Leydig par un processus passif non saturable (Hoggard *et al.*, 1997 ; Caprio *et al.*, 2001). La leptine exerce alors rapidement une inhibition de la production de testostérone, activée par LH (Caprio *et al.*, 1999). Par contre, la leptine n'inhibe pas cette production durant la période prépubère.

Des injections de leptine à des rats présentant un hypogonadisme relance le développement des testicules sans modifier la masse corporelle. Chez des rats normaux, ces mêmes injections accélèrent l'apparition de la puberté (Almog *et al.*, 2001).

La leptine aurait donc la capacité d'activer la puberté et la production de testostérone qui, elle, procèderait à un feedback négatif sur la leptine.

Dans l'ovaire, l'expression de l'ARNm codant pour le récepteur de la leptine est très élevée au niveau des cellules de la thèque et de la granulosa (Karlsson *et al.*, 1997).

Des études *in vitro* ont démontré que des concentrations de leptine trop élevées (correspondant aux concentrations de leptine mesurées chez des individus obèses) ont un effet négatif sur la sécrétion des stéroïdes ovariens (Spicer *et al.*, 1998 ; Caprio *et al.*, 2001). Ainsi, si le taux de leptine est beaucoup trop élevé, il inhibe la production d'oestradiol par l'ovaire, ce qui entraîne une diminution des pulses de LH et peut conduire à une anovulation.

Il existe également une hypothèse selon laquelle le nombre de récepteurs dans les cellules de la granulosa diminue durant le développement des follicules, rendant les follicules de De Graaf moins sensibles à la leptine (Spicer *et al.*, 2001).

De même, le développement des ovaires, la maturation des follicules et la puberté sont favorisés chez des rats femelles sous apport de leptine (Almog *et al.*, 2001).

### **3.2.5. La leptine et le cycle menstruel**

On sait que l'on peut trouver des récepteurs à la leptine dans l'endomètre. Il est toutefois intéressant de constater que la quantité d'Ob-R varie selon la phase du cycle menstruel (Kitawaki *et al.*, 2000 ; Moschos *et al.*, 2002). Ainsi, durant la phase proliférative, on observe un taux minimal de Ob-R, ce taux augmentant graduellement durant la phase sécrétoire. Ceci impliquerait les ovaires dans la régulation de l'expression de l'ARNm des Ob-R.

En Février 2004, trente femmes se sont portées volontaires pour participer à une étude sur la quantité de leptine libre ou circulante ainsi que la concentration en récepteur selon les phases du cycle menstruel (Geisthovel *et al.*, 2004). Tout au long de leur cycle, les chercheurs ont prélevé le sang de ces femmes afin d'effectuer les dosages précités ainsi que la LH, la FSH et l'oestradiol.

Les résultats sont reportés graphiquement à la figure 16. La quantité de leptine libre atteint un pic au milieu de la phase lutéinique et son minimum se situe au début de la phase folliculaire (fig. 16D). Il semblerait que l'oestradiol favorise la production de la leptine de la phase folliculaire à la phase lutéinique. Par contre, les quantités de leptine liée à ses récepteurs et de récepteur de type court dans le sérum ne varient pas selon les phases du cycle menstruel.

Ces constatations laissent penser que la leptine pourrait intervenir dans l'implantation de l'embryon et dans le développement du fœtus. D'ailleurs, de nombreux cas de femmes ayant un défaut de maturation de l'endomètre mais des concentrations normales d'hormones stéroïdes et souffrant d'infertilité ont révélé une déficience fonctionnelle des Ob-R.

Des injections de leptine à des rats immatures femelles conduit à une puberté avancée, au développement des follicules et à une diminution de l'apoptose de ces follicules (Almog *et al.*, 2001).

Notons qu'après la ménopause, le taux de leptine diminue de façon exponentielle. De plus, on observe une forte corrélation entre la concentration plasmatique de leptine et la température corporelle (Brooks-Asplund *et al.*, 2004), ce phénomène étant la conséquence du contrôle du métabolisme énergétique par la leptine.

### **3.2.6. La leptine et la gestation**

Durant les six derniers mois de gestation, le taux de leptine d'une femme atteint des sommets. Ce n'est qu'après l'accouchement que la leptine retombe brusquement jusqu'à des valeurs normales (Chehab *et al.*, 1997). Cette augmentation de production de la leptine semble être due à la sécrétion de leptine et de Ob-R par le placenta. Ces sécrétions sont alors rejetées dans la circulation sanguine de la mère (Dotsch *et al.*, 1999).

En parallèle de ce phénomène, on observe des modifications de la production d'hormones comme l'insuline, hCG et les oestrogènes, ce qui peut moduler la sécrétion de leptine par l'organisme de la mère (Sivan *et al.*, 1998 ; Caprio *et al.*, 2001).

Notons que le fœtus produit également de la leptine. La leptine est détectée dans le liquide amniotique et le plasma fœtal dès 18 semaines d'aménorrhée. A la naissance, la quantité de leptine au niveau du cordon ombilical est élevée et en corrélation directe avec la masse corporelle du bébé (Haugel-de Mouzon et Lepercq, 2001).

Le placenta exprimant beaucoup de Ob-R, on peut supposer que la leptine qu'il produit agit à la fois sur le placenta lui-même et sur d'autres organes. La protéine pourrait alors servir de lien informatif entre la mère et l'enfant sur l'équilibre énergétique, ou même intervenir dans l'évolution du fœtus comme facteur de croissance (Wauters *et al.*, 2000). On retrouve la leptine dans les cellules cyto- et syncytiotrophoblastiques de la face maternelle du placenta ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales des capillaires fœtaux qui sont en contact étroit avec le sang de la mère (Haugel-de Mouzon et Lepercq, 2001).

Le rôle de cette leptine n'est pas encore connu. En tant qu'hormone libérée dans le sang de la mère, la leptine placentaire pourrait jouer le rôle de régulateur du métabolisme et des réserves lipidiques. Elle pourrait également agir localement en tant que cytokine (Haugel-de Mouzon et Lepercq, 2001).

A l'inverse, la diminution soudaine du taux de leptine après l'accouchement pourrait jouer un rôle dans l'inhibition des facultés reproductives de la mère durant la période de lactation.

### **3.2.7. La leptine et la lactation**

La présence de leptine dans le lait maternel a été prouvée par des dosages multiples sur des populations diverses. La protéine résulterait de la production locale par les cellules épithéliales mammaires et de la diffusion à partir de la circulation maternelle (Moschos *et al.*, 2002).

Des brebis, après agnelage, sont incapables d'allaiter leur petit si elles présentent une déficience en leptine ou en Ob-R.

Le pic d'expression des Ob-R dans les glandes mammaires se situe à la moitié de la période de gestation chez les ovins. Cette période correspond au début de la croissance des glandes mammaires et de la prolifération des cellules épithéliales (Moschos *et al.*, 2002).

La leptine et les oestrogènes seraient donc des facteurs de croissance locaux, la leptine servant de lien entre les adipocytes et les cellules mammaires, faisant passer l'information de l'équilibre énergétique optimal au développement des glandes de lactation.

### **3.3. La leptine et le système immunitaire**

Chez des individus ob/ob ou db/db, on peut observer une atrophie des organes lymphoïdes et un dysfonctionnement immunitaire similaires aux phénomènes observables chez des personnes souffrant de malnutrition. En effet, la quantité de lymphocytes B et T est moindre, traduisant une relation entre le taux de leptine et la lymphopoïèse (Sanchez-Margalet *et al.*, 2003).

La leptine favorise la production de cytokines, et des individus déficients en leptine présentent des macrophages à phénotype anormal (Lee *et al.*, 1999).

De plus, la leptine a la capacité de favoriser la production de l'IL6 (interleukine 6) et du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor). Pour rappel, l'IL6 induit la prolifération des cellules B et T, et le TNF $\alpha$  est une cytokine proinflammatoire qui possède des facultés de facteur de croissance et de différenciation de nombreux types cellulaires.

Des récepteurs Ob-R<sub>S</sub> et Ob-R<sub>L</sub> ont été mis en évidence en surface des monocytes et lymphocytes (Loffreda *et al.*, 1998 ; Sanchez-Margalet *et al.*, 2003). Une fois la protéine liée à son récepteur, elle peut activer le signalling intracellulaire JAK - STAT – MAPK – IRS décrit plus haut.

Des études ont, aussi, permis de déterminer l'action anti-apoptotique de la leptine sur les monocytes (Najib *et al.*, 2002).

Cette relation leptine - système immunitaire peut être perçue sous un autre angle: lors d'une infection, le taux de leptine augmente légèrement, laissant présager une réaction d'autoprotection du corps.

La leptine peut donc être considérée comme le lien entre le statut nutritionnel et le système immunitaire. La famine entraîne donc une diminution des stocks de leptine se traduisant par une déficience du système immunitaire ayant pour but l'économie de l'énergie au bénéfice des muscles et du cerveau.

### **3.4. La leptine et la régulation de la composition osseuse**

Cela fait longtemps que l'on a pu observer une corrélation entre la masse corporelle et la masse osseuse (Felson *et al.*, 1993 ; Hamrick *et al.*, 2004).

La leptine augmente la croissance osseuse (Steppan *et al.*, 2000 ; Hamrick *et al.*, 2004) et agit directement sur les cellules stromales de la moelle osseuse pour activer leur différenciation en ostéoblastes et inhiber leur différenciation en adipocytes (Thomas *et al.*, 1999 ; Hamrick *et al.*, 2004).

Par contre, l'injection intracérébroventriculaire de leptine entraîne une perte osseuse (Ducy *et al.*, 2000).

Il existe donc une régulation de la masse osseuse par la leptine selon deux chemins opposés : la stimulation de la croissance osseuse lors d'une administration périphérique et un relais hypothalamique qui inhibe la formation osseuse lors d'une administration centrale (Reseland *et al.*, 2002).

Toutefois, les modifications de masse et de densité osseuse varient selon l'élément du squelette observé : les fémurs ont tendance à être plus courts et plus fins chez les individus obèses (fig. 17) tandis que la colonne vertébrale est plus longue et plus dense mais comporte plus de travées (Hamrick *et al.*, 2004).



Figure 17 : Radiographies de fémurs provenant de deux souris : une maigre (gauche) et une obèse (droite). On observe une modification de l'épaisseur et de la qualité osseuse selon la masse corporelle. (Hamrick *et al.*, 2004).

L'administration de leptine ovine recombinante, même en faibles doses, entraîne une diminution de la production de GH (Growth Hormone), de même que celle de GHRH (Growth Hormone Release Hormone) ou de GHRP (Growth Hormon Release Peptides) (Roh *et al.*, 2001).

La leptine a donc une influence directe sur les fonctions hypophysaires. Cet effet dépend toutefois du mode d'administration de la leptine puisque des injections intracérébroventriculaires entraînent une augmentation de la GH, résultat en contradiction totale avec les résultats précités (Tannenbaum *et al.*, 1998 ; Roh *et al.*, 2001).

### **3.5. La leptine et la régulation de la pression sanguine**

L'injection en intraveineuse de leptine dans la circulation systémique provoque une diminution de la pression artérielle chez le rat (Lembo *et al.*, 2000).

A l'inverse, la leptine possède également une activité d'augmentation de la pression sanguine de par son activation du système nerveux orthosympathique. De plus, l'injection de leptine dans la carotide augmente la pression artérielle (Shek *et al.*, 1998 ; Matsumura *et al.*, 2003).

L'action de la leptine sur la pression artérielle dépend donc du site d'injection.

La leptine est donc un peptide qui, parallèlement aux actions combinées d'autres molécules tel NPY, régule l'activité orthosympathique et donc la pression sanguine (fig. 19).

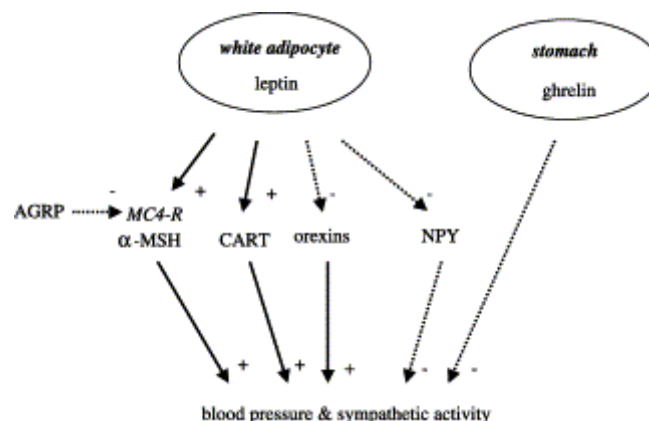


Figure 19 : Mécanismes supposés de régulation de l'activité orthosympathique et de la pression sanguine par la leptine et d'autres peptides. (Matsumura *et al.*, 2003).

## **4. Facteurs influençant la production de leptine**

Les facteurs susceptibles de moduler la synthèse et la libération de leptine sont nombreux et divers.

### **4.1. Le sexe du sujet**

Des études menées chez l'homme comme chez le mouton ont démontré une concentration plasmatique de leptine plus élevée chez les sujets féminins (Havel, 2001). Cette donnée semble tout à fait logique puisque les femelles sont dotées d'une masse grasseuse plus importante que les mâles.



Pourtant, pour des individus des deux sexes présentant un même indice de masse corporelle (BMI), la différence persiste. Des chercheurs ont donc mesuré la quantité de leptine chez des femmes pré- ou post-ménopausées, mais aucune différence significative ne fut observée (Havel *et al.*, 1996 ; Havel, 2001). Il semblerait donc que les hormones sexuelles féminines ne puissent expliquer seules ces données, bien que les effets de l'oestradiol aient été bien démontrés.

De plus amples investigations sont nécessaires afin de déterminer si cette différence peut incomber à une influence des androgènes ou à la distribution spécifique des graisses selon le sexe. La théorie la plus souvent avancée est que les hormones androgènes inhibent la production de leptine, que les oestrogènes l'activent, et que les différences de dépôt graisseux interviennent dans cette régulation (Ahima et Flier, 2000).

#### **4.2. La masse graisseuse**

Comme nous l'avons précisé plusieurs fois, la leptine est produite par les cellules adipeuses et a pour but de réguler l'appétit. Il est, dès lors, évident que plus un individu présentera un BMI (Body Mass Index) élevé, plus il produira de la leptine.

En Mars 2004, Guo *et al.* ont étudié la corrélation existant entre l'expression de la leptine et la taille des adipocytes selon la localisation du tissu graisseux. Chez toutes les souris obèses étudiées, la relation était moindre dans les dépôts graisseux périgonadaux ou rétropéritonéaux par rapport aux régions inguinales. Cette observation se fait également chez des souris de masse corporelle normale.

La taille des adipocytes et leur contenance en lipides sont donc des facteurs déterminants dans le contrôle de la production de leptine.

#### **4.3. Glucocorticoïdes**

Les glucocorticoïdes accroissent la teneur en ARNm de leptine des adipocytes chez le mouton (Houseknecht *et al.*, 1998).

#### **4.4. Insuline**

Il semble que des injections d'insuline augmentent la production de leptine chez les ovins (Mueller *et al.*, 1998 ; Chilliard *et al.*, 1999). Notons qu'une injection combinée d'insuline et de glucocorticoïdes entraîne un renforcement de l'effet de ces molécules sur la production de leptine.

L'insuline régulerait la synthèse et la régulation de leptine par deux voies : la première, majeure, augmente le taux de leptine intracellulaire ; la seconde, mineure, permet la sécrétion d'une réserve de leptine sous forme de vésicules (Bradley *et al.*, 2001).

#### **4.5. Photopériode**

Il est connu que la photopériode a des effets sur la reproduction et l'alimentation des ovins (Kay, 1979 in Chilliard *et al.*, 1999). Des expériences ont été menées dans des groupes exposés à des durées de lumière différentes. Le taux d'ARNm de leptine est accru par la photopériode longue. La photopériode est perçue à travers l'œil et est convertie en signal hormonal, la mélatonine, qui est produite et sécrétée par la glande pinéale (Morgan *et al.*, 1994 ; 2003). En sont la preuve les travaux de Rasmussen et son équipe (Rasmussen *et al.*, 1999 ; Chilliard *et al.*, 1999) qui ont injecté de la mélatonine à des moutons. Le résultat de cet apport en mélatonine fut la diminution de la leptinémie.

Chez le mouton, les récepteurs à la mélatonine sont concentrés dans l'hypophyse et l'hypothalamus (Morgan *et al.*, 2000 ; 2003). De plus, des expériences ont prouvé qu'il y a une corrélation directe entre le taux de neurones exprimant des récepteurs à la mélatonine et le tissu adipeux, prouvant l'importance de la mélatonine et donc de la photopériode dans la régulation de l'équilibre énergétique (Song *et al.*, 2001 ; Morgan *et al.*, 2003).

Il existe donc un lien entre l'horloge biologique des mammifères et les mécanismes de régulation de l'équilibre énergétique (fig. 18).

## **5. Pathologies liées à la leptine**

### **5.1. La leptine et le syndrome de l'ovaire polykystique (PCOS)**

Le PCOS est caractérisé par un dysfonctionnement menstruel, l'hypersécrétion des androgènes, l'obésité, la résistance à l'insuline et une production anormale de GnRH aboutissant à des concentrations de LH et FSH trop élevées (Moschos *et al.*, 2002).

Les femmes souffrant de ce syndrome ne présentent pas de différence significative au niveau des concentrations en leptine circulante, mais leur taux de leptine intrafolliculaire est trop élevé.

### **5.2. La leptine et les désordres alimentaires**

L'anorexie est la première pathologie alimentaire ayant éveillé l'intérêt des scientifiques étudiant la leptine. Le principal symptôme accompagnant l'anorexie nerveuse est l'aménorrhée qui s'installe au fur et à mesure que la patiente perd du poids. Cette aménorrhée semble avoir une origine principalement hypothalamique.

La leptinémie chez les femmes anorexiques est nettement inférieure aux patientes avec un poids normal mais reste en corrélation étroite avec la masse corporelle et la proportion de graisse (Moschos *et al.*, 2002). Le suivi d'un régime alimentaire et la prise de poids entraînent une augmentation de la production de leptine qui s'accompagne d'une sécrétion plus élevée de FSH et de LH. Si cette évolution est nécessaire, elle n'est toutefois pas toujours suffisante comme nous en avons parlé plus haut.

La boulimie se situe à l'autre extrême des anomalies alimentaires. Étonnamment, les quantités de leptine sont plus basses chez ces patients que chez des personnes en bonne santé. Toutefois, cette diminution est moindre chez les boulimiques que chez les anorexiques (Moschos *et al.*, 2002).

Les désordres observés dans le cycle menstruel de ces femmes sont du même ordre que chez les femmes souffrant d'anorexie nerveuse, mais ces phénomènes n'ont pas été encore assez étudiés.

### **5.3. La leptine et l'aménorrhée**

Chez les sportives de haut niveau, on observe une suppression de la pulsativité de GnRH et donc une sécrétion insuffisante d'oestrogènes. En comparaison avec des femmes du même âge et de masse corporelle semblable, ces femmes présentent une maturation osseuse et une ménopause retardées (Moschos *et al.*, 2002).

Ces athlètes expriment beaucoup moins de leptine que des athlètes sans problème menstruel.

L'aménorrhée peut aussi apparaître chez des personnes de constitution normale et n'exerçant aucune activité physique astreignante. Il s'agit alors d'aménorrhée hypothalamique. Dans ce cas aussi les femmes présentent une leptinémie inférieure à la normale.

Nous avons déjà beaucoup parlé des cas de souris ob/ob ou db/db. Chez l'homme, la majorité des obèses présentent une insensibilité à la leptine due à un mauvais fonctionnement de la reconnaissance entre la protéine et ses récepteurs. Il existe toutefois des personnes présentant une mutation de leur gène de la leptine. Dans ces deux cas, les patients souffrent de stérilité ou de capacités reproductives déficientes (Moschos *et al.*, 2002).

Il a été constaté que des femmes obèses sont ménopausées plus vite et présentent de plus en plus de cycles anovulatoires selon l'importance de leur excès de poids. Certaines présentent également une atrophie folliculaire importante, à savoir des follicules présentant des signes d'apoptose et ne pouvant donc être fonctionnels.

L'excès de leptine inhibe donc la fonction reproductive.

Rappelons-nous toutefois que les personnes dont la stérilité ou l'obésité sont liées à la leptine sont minoritaires.

#### **5.4. La leptine et les pathologies osseuses**

Les personnes à poids corporel bas, ménopause tardive et hypogonadisme présentent des risques d'ostéoporose plus élevés. La leptine agirait sur le métabolisme osseux de façon indirecte via son influence sur l'axe hypothalamus – hypophyse – gonades et de façon directe. Des expériences *in vitro*, dont nous avons parlé, mettent en évidence l'intervention de la leptine dans la différenciation des cellules stromales en ostéoblastes.

La surface osseuse des souris ob/ob est augmentée mais la densité des os diminue, ce qui peut mener à de l'ostéoporose ou l'avènement de fractures répétées dues à la fragilisation des os (Moschos *et al.*, 2002).

Chez la femme, il est démontré que l'ostéoporose et les fractures osseuses sont moins fréquentes chez des individus présentant un BMI (Body Mass Index) assez élevé.

### **6. Production de leptine recombinante**

#### **6.1. Choix de l'organisme de production**

*Pichia pastoris* n'a pas été retenue pour des problèmes de brevets et de manque chercheurs qualifiés.

Cet organisme permet la production de molécules glycosylées (Laborde *et al.*, 2004), ce que les bactéries ne peuvent faire. Toutefois, la leptine non glycosylée n'étant pas modifiée dans son activité, ce point n'est pas déterminant dans notre sélection. Les techniques décrites par Laborde *et al.*, (2004) restent toutefois très intéressantes et extrêmement précises et complètes pour un expérimentateur cherchant à produire une protéine de cette manière.

Ils ont placé leur insert dans le vecteur pPIC9K qui leur a permis de multiplier les plasmides dans des bactéries puis de transformer des levures pour la production protéique.

La production de leptine dans cette levure aurait permis d'éviter le problème de la formation de corps d'inclusion et donc les manipulations liées à ces corps d'inclusion (extraction des protéines, refolding).

En effet, il semble que les variations d'activité biologique de la leptine recombinante ne soient pas liées au mode de production (bactéries ou levures) mais bien aux méthodes employées pour la purification et le repliement des molécules qui, elles, sont liées au mode de production (Varnerin *et al.*, 1998).

L'organisme utilisé sera donc *E. coli*, bactérie maniable et très utilisée pour la surexpression de protéines recombinantes. C'est l'article de Jeong *et al.* (1999) qui procure le plus de renseignements concernant la production de leptine via ces bactéries.

En effet, ils utilisent des bactéries *E. coli* BL21 DE3 pour la surexpression de leptine recombinante. Cette souche fut également décrite pour la production de leptine par Varnerin *et al.* (1998).

Le choix de cette souche bactérienne pour produire une protéine repose sur ses mécanismes d'induction et d'inhibition de la production protéique. Ces mécanismes sont décrits dans le chapitre « Matériel et Méthodes ».

De même, Jeong *et al.* (1999) conseillent les expérimentateurs en ce qui concerne les quantités d'IPTG à ajouter au milieu de culture liquide pour induire la surexpression de leptine.

## **6.2. Choix du vecteur d'expression**

Varnerin *et al.* (1998) avaient déjà utilisé le vecteur pET15b pour produire de la leptine.

Le choix de ce mode de production repose sur les possibilités de contrôle du promoteur T7 du plasmide pET15b.

Il est important de pouvoir réguler la surexpression d'un gène inséré afin de permettre aux bactéries de se multiplier jusqu'à une concentration suffisante pour obtenir une certaine quantité de protéine, nécessaire à sa purification ultérieure. Dans le cas de pET15b, c'est un répresseur lac qui réprime le promoteur T7 ([www.Novagen.com](http://www.Novagen.com)).

Le seuil de concentration en bactéries à atteindre avant induction conseillé par Varnerin *et al.* (1998) est fixé par spectrophotomètre à une DO de 0,6. Cette concentration atteinte, de l'IPTG est ajouté au milieu de culture liquide à une concentration de 1mM. L'IPTG va permettre l'expression de la protéine (voir « Matériel et Méthodes »).

## **6.3. Purification et mise en évidence de la leptine produite**

Laborde *et al.* (2004) proposaient la purification de la leptine par liaison d'affinité sur colonne échangeuse d'ions. La mise en évidence de la production de leptine recombinante était faite par immunodétection.

Gertler *et al.* (1998), quant à eux, préconisent l'utilisation de colonnes Q-Sepharose pour la purification.

Finalement, pour purifier la leptine taggée histidine, nous nous sommes basés sur la technique de chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA décrite par Varnerin *et al.* (1998). Nous

nous sommes également inspirés de leurs écrits en ce qui concerne l'élaboration des tampons Binding, Wash et Elution.

En ce qui concerne la mise en évidence de la leptine produite, nous avons suivi l'exemple de Laborde *et al.* (2004) et procédé à des Western Blot, immunodétections et révélations sur papier autoradiographique.

Ce chapitre a pour but de décrire de manière générale les méthodes classiques de biologie moléculaire utilisées dans ce travail, depuis l'isolation de l'ARN et la production de l'insert d'ADNc, en passant par son introduction comme gène actif dans la bactérie, jusqu'à l'isolation et l'étude de la protéine produite.

Les techniques et réactifs spécifiques ayant fait l'objet des recherches de mises au point de ce travail sont présentés dans le chapitre « Résultats ».

## **1. Extraction de l'ARN des cellules adipeuses**

### **1.1. Principe**

La méthode utilisée est une technique commerciale classique, celle du Tri-Pur, solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate, qui maintient l'intégrité de l'ARN lors de la destruction et de la dissolution des composants cellulaires. Après ajout de chloroforme et centrifugation, la phase aqueuse est éliminée et l'ARN extrait de la phase organique par précipitation à l'alcool isopropylique.

L'ARN obtenu nous servira de template pour la RT-PCR.

### **1.2. Protocole**

Le protocole utilisé au laboratoire de physiologie animale est le suivant :

- Conserver les tubes dans la glace pilée
- Ajouter 200 mg de tissu adipeux à 1 ml de TriPur (réf. 1 667 157, Roche) dans un tube à fond rond de 15 ml
- Homogénéiser à l'Ultraturax de 1cm de diamètre nettoyée avec NaOH et eau DEPC stérilisée (environ 3 minutes d'homogénéisation avec des mouvements verticaux et de rotation)
- Placer dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et laisser reposer 5 minutes à température ambiante
- Centrifuger avec une microcentrifugeuse à 4°C à 12000 rpm pendant 15 minutes, collecter l'excès de graisse en surface avec un tip de 1ml
- Verser le surnageant dans un tube et laisser reposer 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 200 µl de chloroforme 99+% (réf. C-2432, Sigma)
- Mélanger par inversion puis laisser reposer 5 minutes à température ambiante
- Centrifuger à 4°C à 12000 rpm pendant 15 minutes
- Prélever la phase transparente supérieure contenant l'ARN à l'aide d'une pipette 100µl (l'ARN et les protéines sont dans la phase blanche tandis que la fraction organique se trouve dans la phase rouge)
- Ajouter 500 µl d'isopropanol 99+% (réf. I-9516, Sigma) par ml de TriPur
- Mélanger par inversion puis laisser reposer 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger à 4°C à 12000 rpm pendant 10 minutes
- Eliminer le surnageant
- Laver le culot d'ARN avec 1 ml d'éthanol 75% en vortexant
- Centrifuger à 4°C à 7500 rpm pendant 5 minutes
- Eliminer le surnageant et sécher le culot à l'air libre, mais pas complètement afin de pouvoir le dissoudre facilement
- Resuspendre le culot dans du T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (20 µl) en passant plusieurs fois la solution dans le tip
- Incuber à 55°C pendant 10 minutes
- Conserver sur glace pilée ou à -20°C

## 2. Dosage des acides nucléiques

### 2.1. Principe

Les acides nucléiques absorbent les UV à 260nm.

1 DO = 50µg/µl ADN ds

40µg/µl ADN ss

33µg/µl ARN

### 2.2. Protocole

Mesurer la DO avec le spectro : on obtient la concentration en ARN, on peut aussi déterminer la pureté de notre échantillon en calculant le rapport de l'absorbance à 260nm et de l'absorbance à 280nm.

## 3. RT- PCR

### 3.1. Principe

Transformation d'un fragment d'ARN en ADN à l'aide d'une « reverse transcriptase » puis amplification de ce fragment à l'aide d'amorces spécifiques en amont et en aval de la séquence d'intérêt. Le principe de la PCR est décrit à la figure 20.

### 3.2. Réactifs et solutions

❖ *Pour la reverse transcription*

- Kit Super-Script RnaseH (de Gibco BRL catégorie 18003-017) selon le protocole du fabricant (100U de reverse transcriptase, 4µg ARN)
- Mélanges RT1 et RT2 préparés à l'avance et congelés selon le protocole du fabricant

❖ *Pour la PCR*

- Kit Taq DNA polymérase, Cloned for PCR (5U/µl) (réf. T0303V de Amersham Pharmacia Biotech)
- Mélange PCR préparé à l'avance selon le protocole du fabricant et congelé

### 3.3. Protocole

❖ *Pour la reverse transcription*

- Préparer le mélange RT1 et conserver à -20°C  
(10µl = 100ng de random primers (Gibco) par tube, 4µl de dNTP Mix 10mM (dNTP Set réf. 27-2035-01 de Amersham Pharmacia Biotech, dilution dans T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>) et 106µl d'eau distillée stérile)  
Congeler.
- Préparer le mélange RT2 et conserver à -20°C  
(40µl de buffer 5X et 20µl de DTT)
- Ajouter 12 µl de mélange RT1 à 4 µg d'ARN<sub>tot</sub> dans un microtube à centrifuger :
- Chauffer le mélange à 65°C pendant 5 minutes et refroidir rapidement sur de la glace
- Ajouter 6 µl de mélange RT2
- Mélanger doucement
- Incuber à 25°C pendant 10 minutes puis à 37°C pendant 2 minutes
- Ajouter 1 µl (200U) de Superscript RT II
- Mélanger en pipetant doucement
- Incuber 50 minutes à 37°C
- Inactiver la réaction en chauffant à 70°C pendant 15 minutes

- Placer dans la glace pour la PCR ou conditionner pour la congélation

Rem : utilisation Thermocycler avec bonnet chauffant (PTC-0150 Minicycler version 4.0 de chez BIOzym)

❖ *Pour la PCR*

- Préparer le mélange PCR pour 1ml : 5µl de chaque primer à 100µM, 32µl de dNTP 25mM (dNTP Set réf. 27-2035-01 de Amersham Pharmacia Biotech), 50µl de MgCl<sub>2</sub>, 100µl de tampon PCR 10X, 808µl de H<sub>2</sub>O
- Conditionner le mélange PCR en le chauffant à 85°C pendant 10 minutes
- On mettra d'abord tout ce qui n'est pas échantillon afin d'éviter les contaminations
- Ajouter la Taq polymérase (1,5 µl pour 1ml de mélange PCR)
- Mélanger et mettre sur glace
- Mettre 20 µl de produit de RT par tube
- Mélanger
- Conserver à 4°C jusqu'à la mise sur la machine
- Machine PCR (thermocycler) :
  - 1 minute à 94°C
  - 30 cycles :
    - 1 minute à 94°C
    - 30 secondes à 61°C (température de melting de notre forward primer 1) ou à 60°C (température de melting de notre forward primer 2)
    - 1 minute à 72°C (température d'élongation)
  - 10 minutes à 72°C

Rem : utilisation Thermocycler (PTC-0150 Minicycler version 4.0 de chez BIOzym)

#### 4. PCR diagnostique

- Préparer un mix PCR pour 25 tubes : 30µl de chaque primer spécifique du vecteur d'expression utilisé (ici pET15b), 60µl de dNTP, 150µl de tampon PCR 10X et 1140µl d'eau
- Si PCR diagnostique sur minipreps, mélanger la miniprep 25X au mix PCR dans un volume final de 50µl
- Si PCR diagnostique sur colonies, mélanger le mix 4X et un échantillon de colonie dans un volume final de 50µl.
- Thermocycler :
  - 2 minutes à 94°C
  - 30 cycles :
    - 45 secondes à 94°C
    - 45 secondes à 54°C
    - 1 minute à 72°C (température d'élongation)
  - 10 minutes à 72°C

#### 5. Electrophorèse sur gel d'agarose

##### 5.1. Principe

L'ADNc obtenu est mis à migrer sur un gel d'agarose 1% afin de vérifier sa taille et d'estimer sa pureté (plus on a de bandes sur le gel, moins l'ADNc est pur). Un étalon de fragments



d'ADN de tailles connues (Smartladder de Bioline) est mis à co-migrer afin d'estimer la taille des bandes d'ADNc obtenues (figure 21). L'ADN est détecté grâce à du bromure d'éthidium qui s'intercale entre les 2 brins d'ADN et est visualisé sous transilluminateur UV à 302nm. La fluorescence d'un fragment sera proportionnelle à la quantité d'ADN dans nos échantillons.

## **5.2. Protocole**

- Préparer le gel d'agarose :
  - Ajouter 1,5 g/100 ml d'agarose à 100 ml de TAE 1x (Tris-acétate 40mM, EDTA 1mM, pH 8)
  - Chauffer au micro-ondes jusqu'à ébullition
  - Laisser refroidir sous agitation lente pour éviter les bulles
  - Quand la température est inférieure à 45°C, ajouter 2µg/ml de bromure d'éthidium
  - Couler le gel
  - Laisser solidifier
  - Remplir la cuve (cuve à électrophorèse BIOplastics BV) avec 900ml de tampon de façon à recouvrir la surface du gel
  - Le gel peut être chargé après refroidissement à température ambiante
- Traitement des échantillons :
  - Ajouter 1/10 de tampon de chargement colorant dans chaque tube
  - Déposer les échantillons et le marqueur (Hyperladder ou Smartladder) dans les puits du gel d'agarose
  - Laisser migrer dans le tampon TAE 1x durant 45 minutes sous une différence de potentiel (ddp) de 150mA, l'ADN migrera vers l'anode
- Visualisation des bandes au transilluminateur (UV transilluminator UVP, Model M-15, 230 V □□□□~50Hz, 0,75Amps, Upland, CA 91786 USA) réglé à 302 nm
- Enregistrement numérique de l'image (Appareil photo numérique avec zoom NIKON Coolpix 990, 3.34 Mega Pixels, programmé en qualité FINE)
- Analyse des bandes avec le logiciel NIH Image 1.62 après que l'image en couleurs ait été transformée en niveaux de gris avec Adobe Photoshop 5.5 et enregistrée en format TIFF

## **6. Purification et extraction des produits PCR après migration sur gel**

### **6.1. Principe**

La bande du gel contenant l'ADN est découpée et solubilisée dans du tampon (Binding Buffer).

L'ADN est fixé sur des colonnes de purification et lavé deux fois au Wash Buffer. Tout ce qui n'est pas ADN est élué, récupéré dans un eppendorf et jeté.

L'ADN est élué à son tour grâce à l'Elution Buffer et récupéré dans un eppendorf à conserver à -20°C jusqu'à utilisation.

Le passage des tampons sur la colonne est forcé par centrifugation.

### **6.2. Réactifs, solutions et matériel**

- Concert Gel Extraction Systems, Life Technologies, Gibco BRL (cat. No. 11456) comprenant filter tubes (colonnes de purification 700µl), eppendorfs stériles de lavage (2ml) et de récupération (1,5ml), Wash (L1 et L2) et Elution Buffers (TE))

### **6.3. Protocole**

- Découper la bande d'ADN sur le gel d'agarose et peser
- Placer la bande dans un eppendorf stérile
- Purifier sur colonne selon le protocole du fabricant

## **7. Réaction de ligation**

### **7.1. Principe**

Le but de cette étape est de lier de façon covalente deux fragments d'ADN : notre ADNc d'intérêt, amplifié par PCR et purifié (insert), et un vecteur (plasmide). Pour ce faire, nous utilisons l'ADN ligase du phage T4 (Invitrogen, 1U/ $\mu$ l) qui va catalyser la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyl 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' de l'autre ADN.

Pour être active, l'enzyme a besoin d'un tampon de ligation contenant de l'ATP et du magnésium.

Le principe de la ligation de fragments d'ADN est représenté à la figure 22.

### **7.2. Protocole**

- Mélanger insert (ADNc de la leptine ovine) et plasmide dans un tube Eppendorf (ici, dans un rapport insert/plasmide de 3/1)
- Ajouter le tampon de ligation (1/10<sup>e</sup> du volume final)
- Ajouter la quantité de ligase nécessaire en fonction de la quantité d'ADN
- Compléter le mélange avec de l'eau stérile
- Incuber 1h30 à température ambiante

## **8. Transformation bactérienne**

### **8.1. Principe (fig. 23)**

Une fois l'insert et le plasmide liés, il faut faire entrer le nouveau vecteur dans des bactéries. Ces bactéries ont été rendues compétentes par perméabilisation de la paroi et de la membrane. Il s'agit de bactéries Gram négatives en début de croissance exponentielle que l'on passe dans une solution hypotonique de chlorure de calcium. La paroi est alors déstabilisée et les bactéries sont considérées comme compétentes.

L'ADN plasmidique forme un complexe avec le calcium. Ce complexe va se fixer à la bactérie et c'est un choc thermique qui va permettre l'internalisation du complexe.

Une fois transformées, les bactéries sont incubées à 37°C en milieu riche afin de régénérer leur paroi puis nous les plaçons sur milieu sélectif afin d'écarter les bactéries non transformées.

Rem : les milieux utilisés doivent être autoclavés 20 minutes à 120°C.

### **8.2. Protocole**

- Travailler en conditions stériles
- Ajouter 10 à 100 $\mu$ g d'ADN de ligation à 100  $\mu$ l de cellules compétentes (100 $\mu$ g/ml)
- Déposer 30 minutes sur glace
- Provoquer un choc thermique de 45 secondes à 37°C
- Ajouter 900 $\mu$ l de milieu riche liquide (2YT : 20g/l de mix pour LB liquide, 6g/l d'hydrolysate de caséine, 5g/l d'extrait de levure, 0,1% d'ampicilline, 0,1% d'IPTG)

- Incuber 30 minutes à 37°C sous agitation
- Etaler sur des boîtes de milieu sélectif (LB : 10g/l d'hydrolysate de caséine, 5g/l de NaCl, 5g/l d'extrait de levure, 12g/l d'agar, 0,1% d'ampicilline, 0,1% d'IPTG)
- Incuber une nuit à 37°C
- Ensemencer des colonies isolées dans 5ml de milieu liquide avec antibiotique
- Incuber une nuit à 37°C avec forte agitation

## **9. Minipréparation d'ADN plasmidique**

### **9.1. Principe**

Cette manipulation comporte 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, la précipitation des protéines et débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique (isopropanol), le lavage de cet ADN (avec de l'éthanol) et sa resuspension (dans de l'eau).

Les deux premières étapes se font grâce à trois tampons : P1 (RNase A 100µg/ml, Tris HCl 50mM, EDTA 10mM, pH8,0), P2 (NaOH 200mM, SDS 1%) et P3 (KAc 3,0M, pH5,5).

### **9.2. Protocole**

- Travailler en conditions stériles (sous flamme)
- Reprendre 1,5ml de la culture liquide préparée après transformation (voir point 8)
- Centrifuger 5 minutes à 12500rpm
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 300µl de P1 et resuspendre
- Ajouter 300µl de P2, mélanger par inversion et incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 300µl de P3, mélanger par inversion et incuber 10 minutes sur glace
- Centrifuger 15 minutes à 12500rpm
- Récupérer le surnageant
- Remplir le tube Eppendorf avec de l'isopropanol
- Centrifuger 15 minutes à 12500rpm
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 300µl d'éthanol 70% à -20°C
- Centrifuger 5 minutes à 12500rpm
- Sécher le culot dans un incubateur à 37°C
- Ajouter 20µl d'eau stérile
- Conserver à -20°C

## **10. Restriction d'ADN**

### **10.1. Principe**

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences, souvent palindromiques, de 4 à 6 paires de bases.

### **10.2. Protocole**

- Prélever une fraction d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée (fragment d'ADN à insérer dans un plasmide, plasmide à restreindre ou produit de ligation)
- Ajouter 1/10 de tampon de restriction 10X, associé à l'enzyme

- La quantité d'enzyme de restriction doit constituer au maximum 1/10 du volume final, soit entre 2 et 10 unités d'enzyme(s) par  $\mu\text{g}$  d'ADN (1 unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement  $1\mu\text{g}$  d'ADN du phage  $\lambda$  en 1 heure à  $37^\circ\text{C}$  dans un volume de  $25\mu\text{l}$ )
- Amener au volume final avec de l'eau distillée stérile
- Incuber le mélange au minimum 1h30 (pour l'ADN plasmidique) ou overnight (pour l'ADN génomique) à la température optimale pour l'enzyme
- Vérifier la restriction par migration sur gel d'agarose 1%, ce qui permettra également de séparer l'ADN restreint des enzymes de restriction pouvant interférer avec la suite des manipulations
- Extraire et purifier les bandes d'intérêt

## 11. Séquençage

### Principe (fig. 24)

Il s'agit d'une amplification d'ADN par PCR avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués à la fluorescéine. Chaque nucléotide possède son marqueur propre détectable à une longueur d'onde spécifique.

L'incorporation des didéoxyribonucléotides stoppe la réaction de polymérisation. Nous obtenons donc une population de brins tronqués qui représente la séquence d'ADN.

La concentration en ADN matrice doit être de 1 à 100 pour de l'ADN génomique et de 200 à 500 pour de l'ADN plasmidique. La quantité d'amorce doit être de  $3,2\text{pM}$ . Chaque échantillon sera présenté en double : une partie avec l'amorce de séquençage forward, et une partie avec l'amorce reverse.

Les produits obtenus sont séparés suivant leur taille par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat est détecté par un système optique relié à un ordinateur qui déterminera alors la séquence de l'ADN matrice.

## 12. Purification de protéines taggées His

### 12.1. Principe

La séquence ADN codant pour la protéine a été insérée dans un plasmide (ici pET15b) puis des bactéries compétentes (ici BL21 DE3 pLysS) ont été transformées avec la construction. Le vecteur choisi permet la production de leptine par la bactérie grâce à une induction à l'IPTG. La protéine obtenue est munie d'une queue de 6 histidines. Nous utilisons de la résine Ni-NTA agarose qui permet la fixation des protéines par ce « tag » de 6 histidines. Le « tag » s'accumule sur la résine par des liaisons non covalentes (fig.25). La purification et l'élution se font grâce à un gradient de concentration en imidazole.

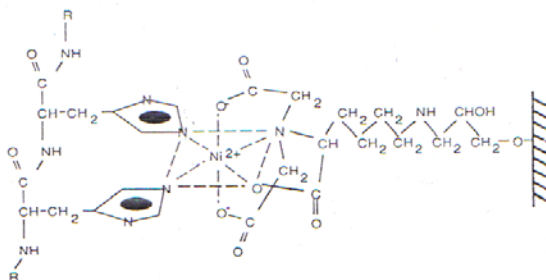


Figure 25 : Interaction entre le tag de 6 histidines et la résine Ni-NTA.

## **12.2. Protocole**

Ce protocole est utilisé pour une première mise en évidence de l'expression de leptine par les bactéries BL21 transformées.

- Centrifuger le milieu de culture liquide contenant les bactéries transformées puis éliminer le surnageant (30 minutes à 5000 rpm)
- Resuspendre le culot dans 1ml de Binding Buffer 1X sans urée (Binding Buffer 8X : 40mM d'imidazole, 4M de NaCl et 160mM de Tris HCl à pH 7,9)
- Congeler et décongeler 3X dans de l'azote liquide afin d'éclater les membranes cellulaires
- 3 étapes de sonication durant 15 secondes
- Centrifuger 30 minutes à 13000 rpm. Le surnageant contient la fraction soluble des protéines et le culot contient les corps d'inclusion
- Resuspendre le culot dans 1ml de Binding Buffer 1X urée 6M
- Placer 1 heure sous agitation à 4°C
- Placer les échantillons sur 350µl de résine Ni-NTA conditionnée au préalable à l'aide de Binding Buffer 1X (sans urée pour les fractions solubles, urée 6M pour les corps d'inclusion)
- Placer 1 heure sous agitation à 4°C
- Lavages :
  - Centrifuger 5 minutes à 3500 rpm, garder le surnageant en cas de problème
  - Ajouter 1,5ml de Binding Buffer 1X sans urée (fractions solubles) ou urée 6M (corps d'inclusion)
  - Centrifuger 5 minutes à 3500 rpm puis garder le surnageant en cas de problème
  - Ajouter 1,5ml de Wash Buffer 1X (Wash buffer 8X : 480mM d'imidazole, 4M de NaCl et 160mM de Tris HCl à pH 7,9, ajouter urée 6M pour les corps d'inclusion) mélangé à du Binding Buffer 1X sans urée (fractions solubles) ou urée 6M (corps d'inclusion)
  - Centrifuger 5 minutes à 3500 rpm puis jeter le surnageant
  - Répéter les deux dernières étapes deux fois
- Eluer la protéine His-tag avec 300µl d'Elute Buffer 1X (Elute Buffer 4X : 4M d'imidazole, 2M de NaCl et 80mM de Tris HCL à pH 7,9) avec ou sans urée selon l'échantillon
- Centrifuger 5 minutes à 3500 rpm et récupérer le surnageant
- Répéter les deux dernières étapes afin de récupérer les éventuels résidus restés fixés sur la résine

## **13. Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)**

### **13.1. Principe (fig. 26)**

Le SDS (Sodium Dodécyle Sulfate) va nous permettre de ne faire migrer nos échantillons que selon leur taille en chargeant toutes les protéines négativement et en provoquant leur dépliement. Les échantillons migrent donc indépendamment de leur charge. Le pourcentage d'acrylamide dans le gel dépend de la taille des échantillons.

### **13.2. Protocole**

- Couler le Running Gel 15% de polyacrylamide (pour 20ml : 4,6ml d'eau, 10,0ml de mix acrylamide 30%, 5,0ml de Tris 1,5M à pH 8,8, 0,2ml de SDS 10%, 0,2ml de APS 10% et 0,008ml de TEMED) entre les deux plaques de verre fixées sur leur support

- Mettre de l'isopropanol au-dessus du gel afin d'empêcher tout contact du gel avec l'air qui inhibe la polymérisation puis l'enlever lorsque le gel est solide
- Couler le Stacking Gel (pour 5ml : 3,4ml d'eau, 0,83ml de mix acrylamide 30%, 0,63ml de Tris 0,5M à pH 8,8, 0,05ml de SDS 10%, 0,05ml de APS 10% et 0,005ml de TEMED) puis placer le peigne qui sera retiré dès que le Stack aura polymérisé
- Remplir la cuve de tampon de migration SDS-PAGE 1X (pour 1l de tampon 10X: 30,35g de Tris, 144g de glycine, 10g de SDS et de l'eau désionisée)
- Charger les puits avec les échantillons protéiques contenant du tampon de chargement 1X (pour 10ml de tampon de chargement 5X: 5ml de glycérol, 2,5ml de  $\beta$ -mercapto-éthanol, 1g de SDS, 3,125ml d'une solution 1M de Tris à pH 6,8 et 0,5mg de bleu de bromophénol)
- Charger un puit avec le marqueur de poids moléculaire
- Migrer 1 heure à 200mA

## 14. Western Blot (transfert sur membrane de nitrocellulose)

### 14.1. Principe (fig. 27)

Le gel SDS-PAGE comprenant nos protéines d'intérêt, après migration, est directement placé dans un montage de type semi-dry afin d'opérer un transfert sur membrane.

### 14.2. Protocole

- Découper une membrane de nitrocellulose ainsi que 6 feuillets de papier Whatman de 1mm aux dimensions du gel à transférer
- Plonger la membrane et le papier Whatman dans du tampon de transfert (pour 2l : 11,6g de Tris, 5,8g de glycine, 0,74g de SDS, 400ml de méthanol et de l'eau)
- Placer le gel, la membrane et le papier selon le schéma présenté en figure 27
- Placer le montage dans l'appareil de transfert (Panther Semi-dry Electrobloetter HEP1 OWL)
- L'ampérage doit varier entre 0,8 et 3mA par cm<sup>2</sup> de membrane
- Opérer le transfert
- Les bandes peuvent être mises en évidence directement par immersion dans du bleu de Coomassie (pour 100ml : 0,25g de bleu de Coomassie R, 45ml de méthanol, 10ml d'acide acétique et de l'eau) durant 30 minutes puis décoloration (pour 1l : 300ml de méthanol, 100ml d'acide acétique et de l'eau)

## 15. Immunodétection

### 15.1. Principe

Il s'agit d'une technique de révélation indirecte.

La membrane obtenue sera incubée dans du liquide contenant un anticorps spécifique de la protéine ou de son tag puis dans un liquide contenant un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Cet anticorps reconnaîtra l'anticorps primaire. La peroxydase est une enzyme catalysant une réaction d'oxydation (substrat = mélange de S1 et S2 de chez Amersham) qui entraîne l'émission de lumière (fig. 28). Cette lumière sera détectée sur papier photographique.

### 15.2. Protocole

❖ *Saturation*

- Incubation 1 heure sous agitation à température ambiante dans une solution de blocking (pour 100ml : 10ml de PBS 1X (1l de PBS 10X : 80g de NaCl, 2g de KCl, 11,5g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et de l'eau) et 5% de lait en poudre): saturation des sites de liaison non spécifique qui pourraient mobiliser les anticorps
- Enlever la solution de blocking et laver la membrane trois fois 10 minutes sous agitation dans du PBS-Tween 0,1%

❖ *Mise en présence de l'anticorps primaire*

- Diluer les anticorps primaire et secondaire à une concentration de 1 à 50µg/ml
- Mettre la membrane en présence de l'anticorps primaire à la concentration recommandée par la firme dans du PBS-Tween 0,05% sous agitation pendant 1 heure
- Laver la membrane une fois 15 minutes et deux fois 5 minutes sous agitation dans du PBS-Tween 0,1%

❖ *Mise en présence de l'anticorps secondaire*

- Mettre la membrane en présence de l'anticorps secondaire à la concentration recommandée par la firme dans du PBS-Tween 0,1% sous agitation pendant 1 heure
- Laver la membrane une fois 15 minutes et deux fois 5 minutes sous agitation dans du PBS-Tween 0,1%

❖ *Révélation* (réactifs ECL (Amersham Pharmacia Biotech))

- Mélanger les solutions S1 et S2 du kit en volume égal et en recouvrir la membrane sur la face où les protéines ont été transférées
- Placer la membrane entre deux feuilles plastiques dans une cassette de révélation et exposer à un film autoradiographique pendant un temps variant selon l'intensité du signal
- Plonger le film dans un bain de révélateur puis rincer à l'eau
- Placer ensuite le film dans le fixateur et rincer à l'eau
- Laisser sécher

## 1. Synthèse des inserts et séquençage du gène de la leptine

### 1.1. Biopsie

Sachant que la leptine est une hormone produite principalement au niveau des adipocytes, du tissu graisseux sous cutané est prélevé sur une brebis afin d'en extraire l'ARN total. Le prélèvement se fait par biopsie sous anesthésie locale à la naissance de la queue.

Dans ce but, des brebis grasses ont été nourries ad libitum pendant une semaine avant la biopsie afin que le gène Ob s'exprime au maximum (Bister et al., 2004a).

Les biopsies sont immédiatement plongées dans l'azote liquide et y sont conservés jusqu'au laboratoire où les cryotubes sont transférés dans le congélateur à -80°C.

### 1.2. Extraction d'ARN

Selon le protocole défini page 25, l'extraction d'ARN a été réalisée sur des fragments de biopsie de l'ordre de 200mg à l'aide d'1ml de Tripur (destruction et dissolution des composants cellulaires), puis 200µl de chloroforme (extraction de l'ARN de la phase aqueuse vers la phase organique) et enfin 500µl d'isopropanol (précipitation de l'ARN).

Après lavage à l'éthanol et séchage, l'ARN est resuspendu dans 20µl de T<sub>10</sub>E.

La DO des échantillons d'ARN total extrait est mesurée à 260nm afin d'en estimer la concentration. Après extraction, nous disposons de fractions d'ARN total d'environ 1,5µg/µl dans 20µl de T<sub>10</sub>E.

Le rendement a donc été de 0,15µg d'ARN par mg de tissu.

### 1.3. Reverse Transcription

La RT est réalisée grâce au test « Super Script RNase H » (Gites BRL) selon le protocole décrit page 26.

### 1.4. Synthèse des inserts

Les manipulations précédentes font partie des techniques de routine du laboratoire de physiologie animale. La suite de la démarche est nouvelle et les expériences sont effectuées en URBM.

#### 1.4.1. Choix des amorces

##### ➤ Elaboration des amorces

Les amorces utilisées pour la RT-PCR ont été déterminées sur base de la séquence ADN de la leptine ovine (fig.29).

```
1  gtgcccatcc gcaaggtcca ggatgacacc aaaaccctca tcaagacgat tgtcaccagg
61  atcaatgaca tctcacacac gcagtcgctc tcctccaaac agaggggtcac tggtttggac
121 ttcattcctg gggtccaccc tctcctgagt ttgtccaaga tggaccagac attggcaatc
181 taccaacaga tcctcgccag tctgccttcc agaaatgtga tccaaatata taatgacctg
241 gagaacctcc gggaccttct ccacctgctg gccgcctcca agagctgccc cttgccgcag
301 gtcagggccc tggagagctt ggagagcctg ggcgctgctc tggaaacctc cctctactcc
361 accgaggtgg tggccctgag ccggtacacag gggctctctac aggacatggt gcggcagctg
421 gacctcagtc ccgggtgctg a
```

Figure 29 : séquence ADN du gène Ob (leptine ovine, [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com), Nucleotide U84247)



La séquence des amorces est telle que le fragment permet l'hybridation de ces primers à des sites spécifiques : en début et fin de la séquence codante. Ainsi, les forward primers ont respectivement leurs 21 et 19 derniers nucléotides en commun avec la séquence ADN de la leptine ovine. La reverse primer s'hybride, elle à l'extrémité opposée du brin d'ADN.

De plus, les amorces doivent respecter la phase de lecture du gène sous peine d'empêcher toute transcription en ARN et donc toute traduction de la protéine à produire. Il ne faut donc aucune insertion ou délétion de nucléotide(s).

La troisième chose à respecter est l'emplacement des codons START et STOP afin de ne pas modifier la longueur de l'insert à transcrire.

Une fois les amorces déterminées, on peut y ajouter des sites uniques de restriction à des enzymes spécifiques qui permettront de découper les extrémités non codantes de l'insert amplifié par RT-PCR. Les extrémités ainsi découpées permettent un clonage directionnel du gène dans le vecteur muni également de sites uniques de restriction à ces enzymes dans son SMC (site multiple de clonage), excluant toute possibilité de production de vecteurs dont l'insert ne pourrait être transcrit puisque serait sous le contrôle du promoteur mais dans le mauvais sens de lecture.

Ainsi, la reverse primer utilisée contient un site de restriction à BamHI et deux forward primers sont utilisés : la première contient un site de restriction à NcoI (insert 1) et la deuxième est spécifique de NdeI (insert 2).

Les raisons de l'utilisation de deux paires d'amorces différentes ainsi que du choix de pET15b comme vecteur d'expression sont expliquées plus tard.

Les amorces synthétisées ne reprennent pas le START natif du gène, les sites de restriction contiennent un autre START permettant d'obtenir des fragments d'ADN de même longueur que le gène originel. Ces nouveaux START respectent la phase de lecture et le nombre de nucléotides de la séquence et ne modifient donc en rien le résultat attendu.

Les amorces citées sont représentées en figure 30.

➤ Forward primer 1 : cette amorce contient un site de restriction de l'enzyme NcoI.

5'GAC/CATGGGTCCCATCCGCAAGGTCCAGG'3

➤ Forward primer 2 : cette amorce contient un site de restriction de l'enzyme NdeI.

5'GACA/TATGCCCATCCGCAAGGTCCAGG'3

➤ Reverse primer : cette amorce contient un site de restriction de l'enzyme BamHI.

5'CAG/GATCCTCAGCACCCGGA(C)TGAGGT'3

Figure 30 : Séquences des forward et reverse primers.

➤ Problèmes rencontrés

La reverse primer (figure 30) a été mal synthétisée. Un nucléotide a disparu, entraînant un décalage du cadre de lecture des 12 derniers nucléotides et par conséquent, une disparition du codon STOP.

Le nucléotide concerné est un C (représenté en gras et plus grand à la figure 30).

L'étude de la séquence du SMC du vecteur pET15b grâce au programme DNA Strider 2.1 a révélé la présence d'un codon STOP 63 nucléotides plus loin que le site de restriction à BamHI où l'insert est placé.

Le programme DNA Strider 2.1 permettant de traduire une séquence de nucléotides en séquence peptidique, la suite des 20 acides aminés excédentaires a pu être déterminée de manière théorique, permettant une comparaison de la leptine attendue à la leptine originelle (fig.31). Cette courte séquence est supposée n'avoir aucune incidence sur l'activité ou la stabilité de la leptine recombinante qui sera produite.

La vigilance est toutefois de mise.

1) Séquence protéique de la leptine ovine :

GPIRKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQRTGLDFIPGLDFIPGLHPLLSSLSKMD  
QTLAIYQQILASLPSRNVIQISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGVVLE  
ASLYTEVVALSRLQGSLQDMLRQLDLIPGA

2) Séquence protéique de la leptine ovine recombinante insérée aux sites NcoI-BamHI de pET15b :

**M**

GPIRKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQRTGLDFIPGLDFIPGLHPLLSSLSKMD  
QTLAIYQQILASLPSRNVIQISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGVVLE  
ASLYTEVVALSRLQGSLQDMLRQLDLIPGA

**EDPAANKARKEAELAAATAEQZ**

3) Séquence protéique de la leptine ovine recombinante insérée aux sites NdeI-BamHI de pET15b :

6 HISTIDINES

**MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM**

VPIRKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQRTGLDFIPGLDFIPGLHPLLSSLSKMD  
QTLAIYQQILASLPSRNVIQISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGVVLE  
ASLYTEVVALSRLQGSLQDMLRQLDLIPGA

**EDPAANKARKEAELAAATAEQZ**

Figure 31 : Modifications de la séquence protéique de la leptine dues à l'allongement des inserts de 63 nucléotides et à l'ajout de la queue d'histidine. Les acides aminés sont représentés par leur première lettre. Les lettres en gras représentent les modifications par rapport à la séquence originelle ainsi que les acides aminés supplémentaires dus aux 63 nucléotides ajoutés par erreur à nos inserts.

La protéine fera donc 20 acides aminés de plus que la leptine originelle.

#### 1.4.2. Amplification des fragments d'ADN

Les températures de melting de ces trois amorces varient entre 59°C et 61°C.

➤ Mise au point du programme PCR

Différents cycles PCR dont les durées et les répétitions sont modifiées sont également testés. Ainsi, les temps d'hybridation et d'élongation varient entre 30 secondes et 1 minute, et le nombre de cycles est passé de 25 à 30. La température a également été variée entre les différentes températures de melting des différentes amorces. Il en résulte qu'aucune différence n'est observée.

Le programme présentant le plus haut rendement est conservé pour les PCR ultérieures et a été présenté dans le chapitre « Matériel et méthodes ».

Il est important de noter que la polymérase utilisée ajoute une queue poly-A aux inserts amplifiés. Cette particularité est importante pour l'étape de clonage en vue du séquençage (voir point 1.2).

#### ➤ Evaluation du protocole de purification

Après migration sur gel d'agarose, les bandes d'intérêt sont découpées à l'aide d'un scalpel sous transilluminateur UV. Les portions de gel sont pesées puis placées dans du tampon de solubilisation (30µl de tampon par 10mg de gel) et purifiées sur colonnes.

Le dixième du produit de purification est chargé sur gel d'agarose 1% afin d'en vérifier la présence et de le quantifier par comparaison de la luminescence avec les bandes du marqueur de poids moléculaire.

Les étapes de resolubilisation et de purification entraînent la perte de matériel génétique. Il faut suivre avec beaucoup de précision les recommandations du kit concernant les quantités de réactifs à utiliser en fonction de la masse de la bande prélevée sur le gel, les temps d'incubation avec les différents réactifs ainsi que les puissances et les temps de centrifugation. Ainsi, si la quantité de tampon de solubilisation à utiliser n'est pas scrupuleusement respectée (mauvaise pesée des bandes excisées ou imprécision de mesure des quantités), l'ADN est perdu avec le gel.

Il est également envisageable qu'une mauvaise centrifugation lors du rinçage à l'éthanol entraîne des difficultés de migration de l'ADN mal séché.

La moindre erreur ou imprécision de la part du chercheur entraîne la perte irrémédiable des inserts migrés.

#### ➤ Résultats obtenus

La figure 32 représente la migration du fragment d'ADN amplifié et purifié (inserts 1 et 2). Les échantillons ont toujours été dosés à approximativement 8ng/µl par comparaison de l'intensité lumineuse des bandes avec les bandes du marqueur de poids moléculaire Smartladder.

### **1.5. Clonage dans pGEMTeasy, transformation dans *E. coli* (DH10B) et séquençage du gène**

#### **1.5.1. Restriction du vecteur pGEMTeasy et ligation**

La taille des fragments d'ADN vérifiée, le plasmide pGEMTeasy est restreint avec l'enzyme de restriction EcoRI afin d'y cloner l'insert 1 ou 2 (fig. 33). Cette restriction ouvre le plasmide au milieu d'une séquence poly-T.

Ce site de restriction permet une ligation non spécifique et non directionnelle des inserts puisque les extrémités poly-A ajoutées aux inserts par la polymérase lors de la PCR vont se fixer aux extrémités poly-T générées par la restriction de pGEMTeasy au site EcoRI.

Il n'est pas nécessaire de s'inquiéter du sens dans lequel l'insert entre dans le vecteur puisqu'il n'est pas sous le contrôle d'un promoteur activateur d'expression. En effet, le but n'est pas ici d'exprimer la protéine mais bien de multiplier le vecteur afin d'extraire plus d'insert par après pour le séquençage et le clonage dans le vecteur d'expression pET15b.

La ligation se fait dans un rapport molaire {insert : vecteur} de {3 : 1} et la solution est mise à reposer une heure à température ambiante.

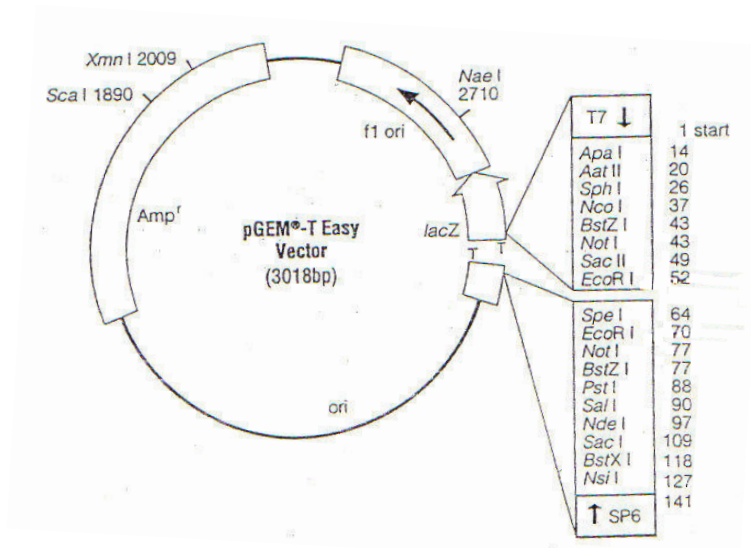


Figure 33 : Vecteur pGEMTeasy et sites de restriction EcoRI pour ligation avec les inserts en vue du séquençage.

### 1.5.2. Transformation des bactéries

#### ➤ Mode de sélection des colonies

Les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu sélectif composé de LB, d'agar, de X-Gal, et d'ampicilline. Seules les bactéries transformées (contenant le vecteur) peuvent pousser sur ce milieu car elles seules sont munies du gène de résistance à l'ampicilline que leur fournit pGEMTeasy (fig.33). Elles seules peuvent donc pousser sur les boîtes

Le gène de la leptine ayant été inséré dans le gène lacZ du vecteur, les bactéries contenant un plasmide vide sont différenciées de celles contenant un plasmide recombinant grâce à un test blanc/bleu. Une fois le gène lacZ disrupted, la bactérie n'est plus capable d'utiliser le X-Gal du milieu pour le transformer en substrat bleu. La colonie reste donc blanche tandis que les bactéries contenant un plasmide sans insert ont leur gène lacZ actif et sont bleues.

Le principe de cette sélection, l' $\alpha$ -complémentation, est détaillé à la figure 34.

#### ➤ Résultats obtenus

Des bactéries *E. coli* DH10B sont transformées avec le produit de ligation afin de multiplier les exemplaires de pGEMTeasy+insert.

Pour plus de clarté, les échantillons de bactéries transformées sont numérotés de 1.(1-12) pour la première paire d'amorces utilisée pour l'insert et le vecteur et 2.(1-12) pour la seconde.

Douze colonies blanches contenant un vecteur recombinant sont prélevées et mises en culture dans du milieu liquide avec ampicilline overnight à 37°C et ce, pour chaque type d'insert (1 et 2).

Nous avons donc 24 échantillons, numérotés de 1.1 à 1.12 et de 2.1 à 2.12.

### **1.5.3. Extraction de l'ADN plasmidique (minipréparation) et restriction diagnostique**

#### ➤ Minipréparation

L'ADN plasmidique est extrait des colonies sélectionnées par minipréparation. Les bactéries subissent des centrifugations et des expositions à différents tampons qui provoquent l'éclatement des membranes (externes et internes) et l'extraction du vecteur.

#### ➤ Restriction diagnostique

Les inserts sont ressortis de leurs plasmides par restriction enzymatique à EcoRI. Il s'agit de la même enzyme utilisée pour intégrer l'insert au vecteur pGEMTeasy. Le fragment d'ADN est donc retrouvé similaire.

Une migration sur gel d'agarose 1% et la comparaison des bandes par rapport à l'Hyperladder permettent la vérification de la présence des inserts dans les plasmides pGEMTeasy mais aussi de les isoler de la préparation contenant l'enzyme de restriction et le plasmide débarrassé de son insert (fig. 35).

Les bandes observées sont à la taille attendue: environ 450 pb pour les inserts et 3000pb pour le vecteur linéarisé pGEMTeasy.

#### ➤ Purification des inserts après migration sur gel d'agarose

Comme précédemment, la bande d'intérêt est excisée du gel, resolubilisée et purifiée sur colonne. Le protocole est cette fois appliqué directement avec attention et précision et les pertes de matériel ADN sont moindres.

Trois solutions d'inserts de chaque type sont envoyées au séquençage afin de comparer les fragments d'ADN à la séquence annoncée.

#### ➤ Séquençage des inserts

Le séquençage confirme l'erreur dans la reverse primer mais ne donne aucune confirmation concernant les nucléotides ajoutés car les primers utilisés se trouvent aux exactes limites de l'insert. Le temps imparti à l'élaboration de ce travail étant limité, il a été impossible de recommander des reverse primers sans erreur.

Pour chaque construction, un clone dont la séquence est la plus fidèle au modèle est sélectionné.

Il s'agit ici des inserts extraits des colonies 1.3 et 2.9 qui sont renommés 1 et 2.

## **2. Clonage du gène OB en vue de son expression par *E. coli* (BL21)**

### **2.1. Choix du vecteur**

#### ➤ Fonctionnement du vecteur pET15b dans les souches BL21 DE3 pLysS

Le vecteur pET15b a été choisi afin de bénéficier des capacités de contrôle de l'expression protéique que lui apporte son promoteur T7 (fig.36 et 37). Ce vecteur avait déjà été utilisé pour la même protéine par Varnerin *et al.*, (1998).

Le promoteur T7 du plasmide d'expression pET15b contient un site de liaison spécifique pour une T7 polymérase. Seule cette polymérase peut activer la transcription des gènes sous le

contrôle de ce promoteur. Il faut donc une T7 polymérase active pour la transcription du gène cloné dans le site multiple de clonage du vecteur.

Les clones sont transformés dans la souche BL21 (DE3-pLysS) de *E. coli* (Varnerin *et al.*, 1998 ; Jeong *et al.*, 1999).

Les bactéries BL21 choisies contiennent un gène DE3. Ce gène est muni d'une séquence codant pour la polymérase T7 sous le contrôle d'un promoteur lac. Ce promoteur est sans cesse réprimé par le produit d'un gène lacI, situé plus loin sur le chromosome bactérien. Le gène lacI code pour un répresseur lac qui va se lier à un site spécifique situé sur le promoteur lac et le réprimer. De même, le promoteur du plasmide pET15b est inhibé par le même répresseur lacI.

La T7 polymérase est également réprimée par un T7 lysosyme produit par les bactéries contenant le plasmide pLysS, ce qui est le cas de la souche utilisée. Il y a donc une double inhibition de la T7 polymérase, ces deux inactivations se faisant à deux niveaux : le répresseur lacI empêche la production de T7 polymérase par le gène DE3 du chromosome bactérien et le T7 lysosyme produit par le gène situé sur pLysS se lie à la T7 polymérase produite pour l'empêcher de se fixer sur le promoteur cible (promoteur T7).

Lors d'une induction à l'IPTG (analogue synthétique du lactose), le promoteur lac du gène DE3 est déréprimé et la T7 polymérase est exprimée. L'IPTG va aussi déréprimer le promoteur T7 du gène cible sur pET15b et la T7 polymérase synthétisée va induire la production de la leptine. L'IPTG empêche donc le répresseur lacI d'agir sur les promoteurs lac et T7 et libère la T7 polymérase de son inhibiteur T7 lysosyme.

Ces mécanismes sont schématisés à la figure 38.

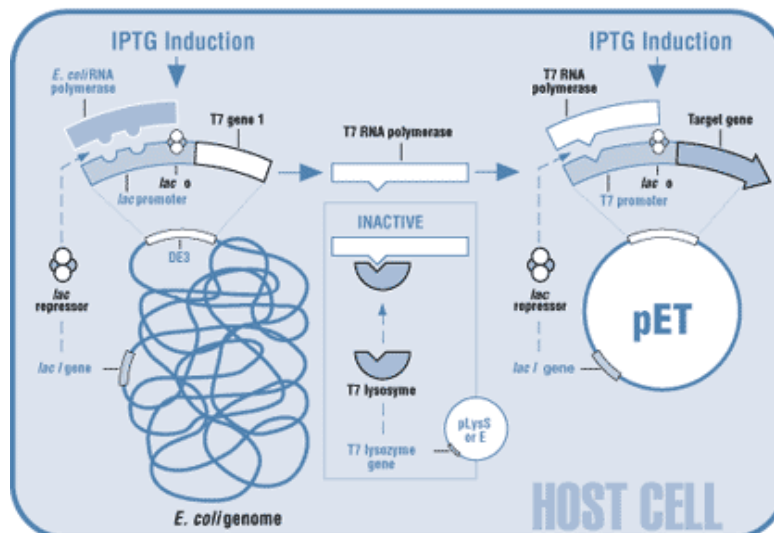


Figure 38 : Contrôle des différents éléments du système pET (cellule hôte DE3 pLysS, pET15b, insert) ([www.Novagen.com](http://www.Novagen.com)).

#### ➤ Choix des amorces en fonction de pET15b

En plus de la possibilité de contrôler l'expression de la leptine par induction à l'IPTG, le vecteur pET15b offre le moyen de tagger la protéine. L'ajout d'une queue de six histidines à la leptine ovine recombinante permet sa purification sur colonne de résine Ni-NTA de façon spécifique et efficace.

La figure 36 montre bien que le clonage d'un insert au site de restriction à l'enzyme NdeI permet d'ajouter à la protéine synthétisée un tag d'histidine tandis que son insertion au site de restriction à NcoI délète la séquence codant pour cette série de six histidines. Ce tag sert d'étiquette de reconnaissance mais également de liaison spécifique à des anticorps ou encore des colonnes de chromatographie.

C'est dans cette optique que deux types de paires d'amorces ont été choisis:

NcoI et BamHI permettent l'insertion du gène dans pET15b tout en déléant la partie codant pour le tag. Il y a alors production d'une leptine brute qui ne peut être purifiée puisqu'il n'y a pas de site de liaison spécifique aux colonnes de purification.

NdeI et BamHI permettent d'insérer le gène juste après la zone codant pour les histidines. Cette leptine pourra donc être purifiée sur résine Ni-NTA. Les six histidines sont suivies d'un site d'expression de la thrombine, ce qui donne la possibilité de couper la queue d'histidine après purification afin d'obtenir une protéine parfaitement comparable à la leptine naturelle. La figure 31 reprend la séquence peptidique attendue pour la protéine taggée 6 histidines. Notons que le tag 6-His est petit, non chargé à pH physiologique, peu immunogène et qu'il n'affecte généralement pas la structure tridimensionnelle de la protéine. Son élimination n'est donc pas obligatoire.

Disposant de deux protéines dont la seule différence sera la présence ou non d'une queue de six histidines, les taux d'expression de leptine pourront être comparés et l'influence du tag sur la production de protéine dans *E. coli* sera évaluée.

La protéine synthétisée sans queue d'histidine devrait avoir une masse moléculaire d'environ 17kDa (16kDa pour la leptine et 1kDa pour les acides aminés supplémentaires) et la leptine 6-His tag devrait faire 19kDa.

## **2.2. Restriction enzymatique et ligation**

### **2.2.1. Restriction des inserts et du vecteur d'expression**

Les inserts retirés des vecteurs pGEMT-easy et dont les séquences sont bonnes sont récupérés.

#### **➤ Restriction**

Etant donné l'utilisation de deux paires de primers différentes, les restrictions du plasmide pET15b et de l'insert en vue de la ligation sont faites avec deux paires d'enzymes différentes : NcoI-BamHI et NdeI-BamHI.

Ces restrictions ont pour but de créer des extrémités différentes sur l'insert et sur le plasmide afin que l'insertion, le clonage, ne puisse se faire que dans un seul sens.

C'est le clonage directionnel.

Ainsi, la séquence codante de la leptine ovine est insérée juste après le promoteur T7, dans le sens de la transcription.

Les deux restrictions (aux sites forward et reverse) se font en même temps: NcoI, NdeI et BamHI agissent toutes trois à 37°C. Les solutions sont incubées une heure à 37°C et un dixième est migré sur gel d'agarose afin de vérifier que la restriction a bien eu lieu (fig.39). Si le résultat attendu est obtenu, l'entièreté de la solution de restriction est migrée sur gel. Sinon, l'incubation est prolongée.

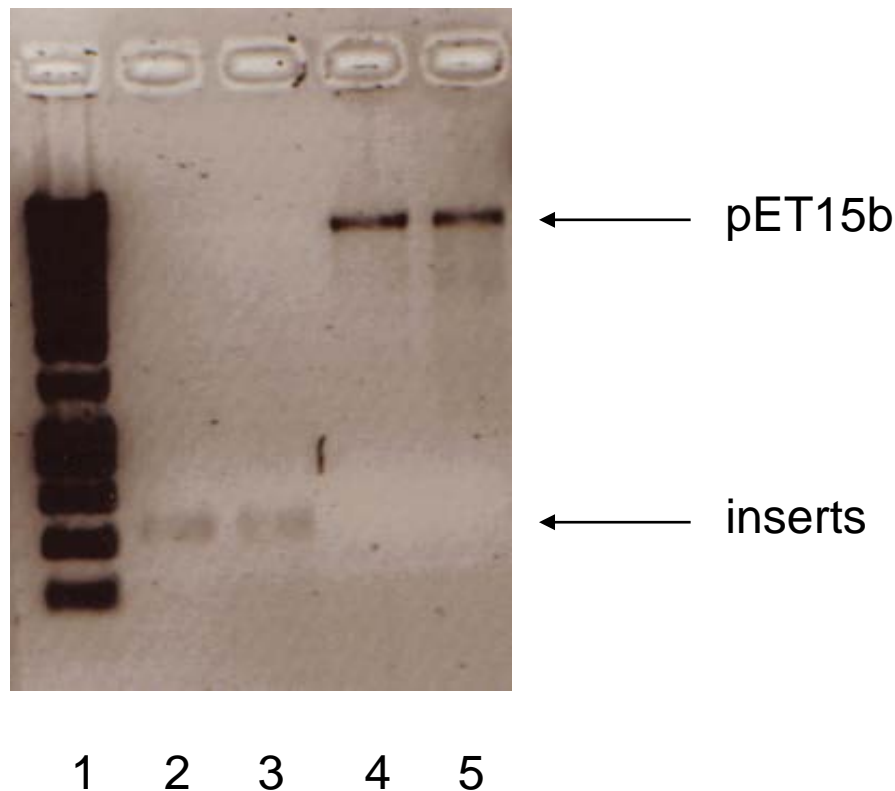


Figure 39 : Migration des inserts et de pET15b, purifiés après restriction.  
 Puits n°1 : Marqueur de poids moléculaire (Hyperladder)  
 Puits n°2 : Insert restreint avec les enzymes NcoI et BamHI puis purifié sur colonne  
 Puits n°3 : Insert restreint avec les enzymes NdeI et BamHI puis purifié sur colonne  
 Puits n°4 : Plasmide pET15b restreint avec les enzymes NcoI et BamHI puis purifié sur colonne  
 Puits n°5 : Plasmide pET15b restreint avec les enzymes NdeI et BamHI puis purifié sur colonne

Les bandes correspondent bien aux prévisions: les inserts se situent à environ 450pb et les vecteurs linéarisés à 3500-4000pb.

#### ➤ Purification

Les inserts et les plasmides sont ensuite purifiés sur colonnes comme décrit précédemment afin de débarrasser le matériel génétique des enzymes de restriction. Cette fois encore il faut veiller à limiter les pertes d'ADN.

Le résultat est visualisé sur gel d'agarose 1%.

#### 2.2.2. Ligation

La ligation dans le vecteur pET15b est faite dans un rapport molaire {insert : vecteur} de {3 : 1}, comme précédemment dans le cas du vecteur pGEMTeasy, et incubée une heure à température ambiante.

La figure 40 représente le plasmide pET15b contenant tour à tour les deux inserts (1 et 2).



## **2.3. Transformation**

### **2.3.1. Transformation des bactéries et mise en culture**

Le produit de ligation est transformé dans des bactéries BL21 (DE3 pLysS) compétentes.

Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar, 100µg/ml d'ampicilline (gène de résistance sur pET15b) et 20µg/ml de chloramphénicol (gène de résistance sur pLysS).

Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

### **2.3.2. Sélection des clones**

#### ➤ Principe

Le vecteur pET15b ne contenant pas de gène lacZ, contrairement au vecteur pGEMTeasy, il est impossible de sélectionner les colonies par test blanc/bleu. Douze colonies de chaque type sont prélevées et mises en culture liquide afin de procéder à des PCR diagnostiques sur colonies ainsi qu'à des restrictions diagnostiques.

Les colonies sont numérotées comme expliqué précédemment (1.(1-12) et 2.(1-12)).

#### ➤ PCR diagnostiques

Les PCR sont menées avec les primers amont et aval « T7 promoter primer » et « T7 terminator primer » (Novagen) qui s'hybrident respectivement avant et après le promoteur T7 situé dans le SMC du vecteur pET15b. La séquence amplifiée est composée de l'insert (environ 450pb) et d'une séquence propre au plasmide (opérateur lac, rbs, His-tag, thrombine, T7 terminator, ... = 200pb). Une bande entre 800 et 1000pb est donc observable après migration sur gel d'agarose 1%, comme montré en figure 41.

#### ➤ Restrictions diagnostiques

Ces restrictions sont faites avec les enzymes SmaI et AccI.

SmaI est une enzyme de restriction agissant à 25°C tandis que AccI agit à 37°C. La restriction est donc faite en deux fois.

Il n'est pas utile d'inactiver les enzymes après les différentes étapes puisque des sites uniques de restriction ont été choisis et puisque les températures de clivage divergent. De plus, les produits de restriction ne seront pas purifiés car il n'est pas utile de les récupérer pour la suite des manipulations.

Le résultat des restrictions diagnostiques est migré sur gel d'agarose 1% (fig. 42).

#### ➤ Problème

Bien que les PCR et restrictions diagnostiques aient démontré la présence d'inserts à environ 450pb, les cultures en vue de l'expression de la protéine n'ont donné aucun résultat.

Les facteurs d'influence de la culture des bactéries ont tout d'abord été modifiés afin d'éliminer toute possibilité d'intoxication des organismes par la leptine produite ou de dégradation de la protéine durant sa production. La température d'incubation a donc varié entre 18°C, 30°C, 34°C et 37°C.

Ces modifications ne donnant aucun résultat, les différents réactifs utilisés ont été contrôlés voir jetés pour être remplacés et éliminer tout risque d'erreur dans le matériel utilisé, mais cela n'a rien changé.

En dernier recours, toutes les manipulations ont été menées en triple: culture de bactéries transformées par les plasmides 1 et 2 (leptine ovine) mais aussi de bactéries transformées par un vecteur contenant le gène de la flagelline, protéine surexprimée au laboratoire de biologie moléculaire.

La flagelline étant produite par la même souche bactérienne, les manipulations et réactifs sont les mêmes que pour la production de leptine. Cette protéine taggée histidine pouvait donc être utilisée comme contrôle positif.

Les Western Blot ont alors révélé la surexpression de flagelline, rejetant la possibilité d'erreur commise par l'expérimentateur lors de ses manipulations.

Un deuxième séquençage a apporté la solution de ces problèmes.

#### **2.4. Séquençage**

Lorsque des colonies transformées par des vecteurs pleins sont mises en évidence mais qu'aucune production de leptine n'a lieu, les inserts en question sont séquencés afin de vérifier qu'aucune mutation n'a eu lieu depuis le séquençage des inserts dans pGEMTeasy.

Il a fallu agir ainsi pour de nombreux inserts avant de pouvoir sélectionner deux clones.

En effet, beaucoup présentaient une délétion des 50 premiers nucléotides, rendant toute surexpression de leptine impossible.

L'insert n'étant plus court que de 50 nucléotides, les migrations sur gel, que ce soit après PCR diagnostique ou après restrictions diagnostiques, n'ont pu mettre cette délétion en évidence car la différence de longueur entre l'insert originel et l'insert muté était trop faible. Les PCR et restrictions diagnostiques prouvaient donc la présence d'un insert dans les plasmides mais lors de l'induction à l'IPTG, aucune protéine n'était produite, et le Western Blot ne mettait en évidence aucune bande.

Face à ces échecs, il ne restait plus qu'à renvoyer les clones sélectionnés au séquençage, qui a révélé cette délétion inattendue de 50 nucléotides accompagnée d'un décalage du cadre de lecture.

Il est donc dangereux de ne se baser que sur un seul séquençage avant de commencer les mises en culture car, de l'induction à l'IPTG à l'immunodétection de la protéine produite en passant par sa purification, il faut une semaine pour avoir les résultats de la surexpression.

Beaucoup de temps a donc été gâché à essayer de produire de la leptine à partir d'un plasmide dont l'insert était délété de 50 nucléotides essentiels à son expression et sa stabilité.

Cette délétion systématique de la même section du fragment d'ADN reste inexplicable, d'autant plus que les deux constructions furent touchées, et que le premier séquençage ne révélait aucune anomalie.

Devant un tel obstacle, il faut chercher à remonter les différentes étapes des expériences menées afin de déterminer à partir de quel moment l'erreur est survenue. En effet, il se peut que tous les inserts conservés avant ligation dans pET15b aient subi les mêmes modifications et qu'il soit alors nécessaire de recommencer les RT-PCR. La décision fut prise de récupérer les inserts sortis de pGEMTeasy et restreints par les paires d'enzymes pour recommencer les ligations dans pET15b et les cultures. Il n'y eut pas besoin de remonter plus loin dans les expériences accomplies.

Par après, ce phénomène ne fut plus observé et la production de leptine put débuter.

### 3. Culture, mise en évidence et purification des protéines

#### 3.1. Culture et mise en évidence de la leptine

##### 3.1.1. Culture des clones 1 et 2

Les colonies contenant les inserts sont mises en culture dans 5ml de LB + Ampicilline (100µg/ml) + chloramphénicol (20µg/ml). Lorsque la DO à 600nm atteint 0.6, les cultures sont stimulées à l'IPTG 1mM. Cette valeur limite de la concentration en bactéries mesurée par spectrophotomètre est la plus utilisée dans le domaine de la surexpression de protéine dans *E. coli*. Varnerin et al., (1998) utilisent d'ailleurs les mêmes données.

##### 3.1.2. Vérification de l'expression de leptine

NB : La leptine avec queue d'histidine ne sera purifiée qu'après vérification de l'expression par les bactéries BL21 afin d'éviter de nouvelles pertes de temps ou encore le gaspillage de résine Ni-NTA.

Les protéines non taggées ne pourront être purifiées de cette manière puisque la fixation à la résine se fait par le tag qu'elles ne possèdent pas. Leur traitement après extraction des bactéries se limitera donc aux étapes détaillées ici.

#### ➤ Préparation des extraits protéiques

Après 4 heures de stimulation, les tubes sont centrifugés afin de séparer les bactéries de leur milieu de culture.

Le culot est resuspendu dans 1ml de Binding Buffer. La solution obtenue subit trois étapes de congélation/décongélation et de sonication afin de terminer l'éclatement des membranes bactériennes. Le tout est ensuite centrifugé une seconde fois.

Le surnageant est conservé pour analyse de sa teneur en protéines solubles et le culot est resuspendu dans du Binding Buffer avec urée (1X, urée 8M) afin de libérer le contenu des corps d'inclusion.

#### ➤ Séparation des fractions protéiques par SDS-PAGE et Western Blot

Les extraits totaux de bactéries ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE 15%) avec le Kaleidoscop Bio-Rad comme marqueur de poids moléculaire. Les gels sont ensuite transférés sur membrane de cellulose par la technique du Western Blot décrite en page 33.

#### ➤ Principe de l'immunodétection et du marquage sur papier autoradiographique

Pour détecter la leptine munie d'une queue d'histidine, un anticorps  $\alpha$ -histidine (anti-histidine) d'origine murine (Sigma cat. H1029, monoclonal non conjugué) et un anticorps secondaire  $\alpha$ -souris (Ac anti-IgG de souris produit chez le lapin) sont utilisés.

L'Ac primaire se fixe de façon spécifique à la queue d'histidine contre laquelle il est dirigé tandis que l'Ac secondaire, qui reconnaît toutes les IgG d'origine murine, se fixe à l'Ac secondaire.

Dans le cas de la leptine sans queue d'histidine, un anticorps  $\alpha$ -leptine polyclonal produit chez le lapin (Affinity Bioreagents PA1-051) et donc un anticorps secondaire  $\alpha$ -lapin (Ac anti-IgG de lapin produit chez la chèvre) sont utilisés.

Comme contrôle, c'est encore la flagelline produite au laboratoire et munie d'une queue d'histidine qui est utilisée. Lorsque c'est à l'anticorps  $\alpha$ -histidine que l'on a recours pour l'immunodétection, une bande doit être mise en évidence au niveau du puits de dépôt de la

flagelline. Si c'est l' $\alpha$ -leptine qui est utilisé comme anticorps primaire, la flagelline ne doit pas marquer le papier autoradiographique.

L'Ac  $\alpha$ -His permet donc de vérifier la présence de l'étiquette d'histidine tandis que l' $\alpha$ -leptine permet d'évaluer l'homologie de structure entre la leptine recombinante obtenue et la leptine naturelle puisqu'une variation de conformation peut empêcher cet anticorps de reconnaître la protéine.

Etant couplé à une peroxydase, l'Ac secondaire permet l'émission de lumière après mise en présence avec les réactifs d'immunodétection. C'est cette émission de lumière qui va marquer le papier autoradiographique en chambre froide.

### ➤ Résultats

La figure 43 montre l'immunodétection et la révélation des extraits protéiques obtenus après culture des deux types de bactéries transformées (1.(1-3) ou 2.(1-3)).

Pour chaque leptine (avec ou sans tag d'histidine), les fractions protéiques solubles ainsi que les protéines extraites des corps d'inclusion ont été détectées.

La flagelline, comme attendu, n'est mise en évidence que par l'anticorps dirigé contre le tag d'histidine et pas par l'anticorps reconnaissant la leptine, ce qui démontre bien la spécificité de chacun des anticorps.

Cependant, l'anticorps  $\alpha$ -leptine met en évidence la première bande du marqueur de poids moléculaire. Les raisons n'en sont pas connues.

De la leptine non taggée a été migrée sur le même gel que les extraits munis d'une queue d'histidine afin de prouver la capacité de l'anticorps dirigé contre la leptine à reconnaître les deux formes produites. Ce test permet donc de tester la similarité de la zone reconnue par l'Ac entre la protéine recombinante produite et la leptine naturelle par exposition à un anticorps spécifique. Ce type de test de liaison fait partie des premières étapes de caractérisation *in vitro* d'une protéine. Dans le cas présenté ici, le résultat de ce test de liaison est favorable.

Sur la figure 43, aucune différence n'est observable concernant les taux de production de leptine entre les fractions solubles et celles extraites des corps d'inclusion. Cette observation semble aller à l'encontre des écrits de Gertler *et al.*, (1998) selon lesquels la majorité de la leptine produite se retrouve sous forme de corps d'inclusion.

Il ne faut toutefois tirer aucune conclusion avant d'avoir utilisé la même technique pour mettre en évidence la leptine purifiée sur colonne car il se peut encore des impuretés faussent les résultats.

## **3.2. Purification de la protéine taggée His**

### **3.2.1. Choix de la méthode de purification**

La leptine taggée 6-His a été purifiée par chromatographie d'affinité.

La résine Ni-NTA (Ni-NTA agarose, Qiagen) utilisée est composée de molécules d'acide nitrilotriacétique (NTA) couplées à des billes de sépharose. Une molécule de NTA interagit de manière stable avec un ion  $\text{Ni}^{2+}$  via quatre sites de coordination, laissant deux sites libres sur l'ion. Les six histidines du tag peuvent se fixer avec une grande affinité sur cet ion. Les

protéines fixées sont éluées en ajoutant de l'imidazole qui entre en compétition avec les histidines.

L'avantage de cette méthode est la haute affinité de la liaison entre l'histidine et la matrice. Cela permet d'obtenir un taux de pureté très élevé (80 à 95%). De plus, cette résine reste stable face aux variations de pH et est insensible aux protéases pouvant se trouver dans les échantillons à purifier.

### **3.2.2. Mise au point de la technique**

Cette méthode présente le désavantage d'entraîner des pertes importantes de protéines. Ainsi, il est utile de procéder à quelques observations pouvant entraîner des mises au point du protocole selon la stabilité de la protéine à purifier.

Dans le cas de la leptine, il faut veiller à procéder à plusieurs éluions et à récupérer les différentes fractions obtenues sous peine de laisser une portion importante de la production accrochée sur la résine.

Le nombre de lavages doit également être réglé selon la protéine à purifier. Ici, deux lavages ont été effectués alors que trois peuvent être faits dans le cas de la purification de flagelline taggée histidine (selon le protocole de production de flagelline, URBM).

Afin de mettre au point les différentes étapes, il est intéressant de récupérer toutes les fractions passées sur la résine (surnageants) et de leur faire subir un Western Blot afin de mettre en évidence les étapes les plus risquées et d'étudier la manière de diminuer les pertes à ces étapes.

Cette technique ne peut être appliquée que sur les séries 2.(1-12) munies d'une queue d'histidine peuvent être purifiées par liaison d'affinité sur colonne Ni-NTA.

Les extraits 1.(1-12) ne peuvent être purifiés de cette manière.

### **3.3. Caractérisation par Western Blot de la protéine purifiée**

La technique de Western Blot utilisée ici est identique à celle décrite plus haut. Le même matériel ainsi que les mêmes réactifs sont utilisés.

Ici, seule la protéine taggée est mise en évidence puisque la leptine simple n'est pas purifiée.

Les anticorps repris sont l'anti-histidine et l'anti-souris.

#### **➤ Résultats**

Le papier radiographique montre bien que la majorité de la leptine produite par les bactéries se retrouve dans les corps d'inclusion (fig. 44).

#### **➤ Problème**

Si on reprend les Western Blot obtenus par immunodétection et révélation de la leptine non purifiée, on peut conclure que la leptine contenue dans la fraction protéique soluble des bactéries est trop faible que pour être encore visible après purification.

En effet, des bandes bien visibles sont observables avant purification tandis que, après éluion des colonnes Ni-NTA, le signal disparaît.

En ce qui concerne les bandes de protéine provenant des corps d'inclusion, le signal est moins diffus et moins intense mais toujours clair. La purification sur colonne entraîne donc des pertes de protéines, bien que le protocole ait été ajusté en fonction de la stabilité de la leptine et de la force de liaison l'unissant à la résine. Ces pertes sont insignifiantes en ce qui concerne

les corps d'inclusion, vu l'importance de leur concentration en leptine ; mais entraînent la perte du signal pour les extraits solubles.

Il est à noter qu'il s'agit ici de surexpression à petite échelle, la culture en plus grand volume et la purification de plus grandes quantités d'extraits protéiques permettraient peut-être de maintenir un signal.

## 1. Discussion

L'idée de départ de ce mémoire était de produire de la leptine ovine recombinante à des fins d'expérimentation.

Devant la structure du plasmide pET15b choisi comme vecteur d'expression pour ses capacités de contrôle du promoteur, la possibilité de faire toutes les manipulations en double afin de produire deux protéines a été envisagée: une leptine taggée histidine, et une leptine simple.

Deux protéines furent donc produites : une molécule de leptine purifiable sur colonne Ni-NTA car munie d'une queue d'histidine et une protéine sans tag d'histidine à laisser sous forme de corps d'inclusion.

Les inserts ont tout d'abord été ligués à pGEMTeasy pour transformation dans des bactéries DH10B en vue du séquençage.

Aucune mutation ou erreur n'a été mise en évidence, pour aucune des deux colonies dont les plasmides ont été extraits pour la suite des manipulations. Le taux de transformation était similaire pour les deux transformants, ne révélant aucune différence de stabilité ou d'efficacité.

Les deux constructions (vecteur pET15b + insert 1 ou 2) ont ensuite été placées dans des bactéries permettant un contrôle supplémentaire de la production de la protéine cible (DE3, pLysS).

Le nombre de colonies transformées a été comparable pour les deux types d'inserts (1 ou 2).

Lors du second séquençage, les mêmes problèmes de délétion de 50 acides aminés du même fragment d'ADN ont été détectés et ce, pour les deux constructions.

Les deux séquences d'ADN ont donc prouvé une même instabilité de la même région génétique.

Les premiers Western Blot accomplis avant purification de la protéine taggée ont permis une comparaison des taux de production pour les deux colonies.

Ces taux étant similaires, on peut conclure que la queue d'histidine ne modifie pas le taux de production ou la stabilité intrabactérienne de la leptine (voir Western Blot des figures 43 et 44).

De plus, l'anticorps anti-leptine reconnaît autant la protéine taggée que la protéine simple. Le tag d'histidine ne modifie donc pas la reconnaissance spécifique de la protéine par son anticorps.

**Le protocole élaboré étape après étape a donc donné des résultats comparables pour chacune des colonies transformées, permettant de mener les expériences en double sans avoir à modifier des étapes en fonction de la colonie utilisée.**

Arrivés au bout de ces expériences, il fallut se demander si tous ces efforts avaient une réelle utilité.

La queue de six histidines ne modifie ni le taux de surexpression dans *E. coli*, ni la reconnaissance spécifique par des anticorps anti-leptine.

On peut donc supposer que ce tag, s'il n'était pas enlevé des protéines contenues dans les corps d'inclusion, n'influencerait pas l'activité de la leptine *in vitro* ou *in vivo*.

Toutefois, n'ayant pas eu le temps d'investiguer sur l'activité biologique de la leptine produite, aucune donnée expérimentale ne peut prouver ces suppositions. Les seules données à ce sujet sont celles de Varnerin *et al.* (1998) qui concluent leur étude en affirmant que la queue de six histidines prolonge les effets de la leptine sans toutefois altérer sa capacité de liaison avec ses récepteurs spécifiques.

Ce tag stabiliserait donc la protéine sans modifier son activité biologique.

La synthèse de deux protéines similaires dont l'une possède un tag d'histidine pourrait donc être utile à l'avenir lors d'un projet de caractérisation de la leptine recombinante ovine produite au laboratoire de biologie moléculaire.

Par contre, produire de la leptine sans étiquette afin de l'injecter directement aux ovins pour observer un éventuel repliement de la molécule *in vivo*, ne justifie plus la synthèse de la protéine en double : il suffit d'exposer la protéine taggée à de la thrombine pour retirer la queue d'histidine (voir structure du plasmide pET15b) ou même de laisser la queue d'histidine supposée sans conséquence sur la structure et l'activité de la leptine.

De même, dès le premier séquençage une erreur commise lors de la synthèse de la reverse primer a été mise en évidence. Le risque de produire une protéine dont la séquence serait plus longue de 20 acides aminés a été pris afin de ne pas perdre de temps à recommander une reverse primer contenant le codon stop attendu.

Si cette variation de la séquence protéique n'a entraîné aucun problème de production, d'autres expériences sont nécessaires pour écarter tout soupçon de dégradation plus rapide *in vivo* ou d'activité biologique modifiée.

Cette petite séquence supplémentaire n'a toutefois pas altéré la stabilité de la leptine, que ce soit dans les bactéries ou lors des manipulations.

## 2. Perspectives

En résumé, nous sommes parvenus à produire deux types de leptine ovine recombinante: une leptine avec tag d'histidine, et une sans. La première protéine a été purifiée, l'autre ne peut l'être par la méthode de la résine Ni-NTA.

Le premier projet à mener à terme est le refolding de la leptine obtenue majoritairement dans les corps d'inclusion. Son extraction et sa purification ont été menés à bien et décrits dans ce travail mais la reconformation n'a pu être faite par manque de temps.

La méthode de refolding étant déterminante pour les capacités biologiques de la protéine (Varnerin *et al.*, 1999), il serait intéressant de procéder à ce refolding par les différentes techniques proposées dans cet article afin de comparer par après l'activité biologique des protéines à structure tertiaire.

A partir de ce matériel, il sera essentiel d'étudier, *in vitro*, les capacités de liaison de la leptine recombinante à des récepteurs membranaires spécifiques.

En effet, si la leptine est reconnue spécifiquement par son anticorps, elle l'est alors qu'elle n'a pas encore subi de refolding. Rien ne prouve qu'une fois enroulée dans sa conformation tertiaire elle le sera par ses récepteurs. Les 20 acides aminés ajoutés accidentellement à sa séquence et le tag de l'une des protéines produites peuvent peut-être interférer avec cette reconnaissance récepteur-ligand.



A nouveau, la bibliographie à ce sujet met à notre disposition plusieurs possibilités.

Gertler *et al.* (1998) ont tout d'abord découpé des tranches d'hypothalamus ovin qu'ils ont exposées à de la leptine couplée à de l'iode radioactive. Cette leptine sature les sites de liaison spécifique. Ils exposent ensuite les tranches d'hypothalamus ainsi traitées à de la leptine recombinante non marquée. La totalité de la leptine marquée à l'iode radioactive est déplacée des récepteurs.

La leptine ovine recombinante qu'ils sont parvenus à synthétiser dans *E. coli* a donc les mêmes capacités de liaison spécifique aux récepteurs de l'hypothalamus que la leptine native.

Laborde *et al.* (2004) ont, eux, évalué l'activité *in vitro* de leur leptine ovine recombinante en étudiant la liaison de celle-ci à ses récepteurs spécifiques. Ces récepteurs se trouvent en membrane de cellules contenant le gène de la luciférase dont l'activation dépend du signalling intracellulaire lié à l'activation de ces récepteurs par leur liaison à la leptine.

Varnerin *et al.* ont utilisé la même technique que Laborde *et al.*, pour étudier l'activité *in vitro* de leptine recombinante.

Ces expériences permettront de déterminer si cette protéine peut être utilisée *in vivo*.

De plus, elles apporteront un premier élément de réponse quant à l'influence de la queue d'histidine et des 20 acides aminés excédentaires sur l'activité de la leptine recombinante produite.

Nous pouvons également caractériser la leptine obtenue par des expériences *in vivo*.

Varnerin *et al.* ont injecté leur leptine recombinante à des souris db/db ou ob/ob tout en contrôlant leur habitat et leur alimentation. Les souris ont été pesées quotidiennement et les données ont été analysées statistiquement. La leptine n'a eu aucune influence sur les souris db/db mais a entraîné un amaigrissement significatif des souris ob/ob traitées.

Etant donné le matériel vivant à notre disposition (troupeau de moutons et brebis), il serait aisé de traiter les animaux avec la leptine et d'observer les effets sur le plan du comportement alimentaire et de la reproduction.

Dans ce cadre, l'injection à des moutons de leptine avec et sans tag permettrait de déterminer dans quelle mesure les six histidines greffées à l'extrémité de la protéine agissent sur son activité.

La seconde forme pourrait également être injectée directement à des moutons, sans avoir été purifiée ou refoldée, afin de déterminer si la leptine peut reprendre sa conformation naturelle directement dans le plasma. Cette capacité éventuelle pourrait dès lors simplifier la production de leptine recombinante biologiquement active puisque l'on contournerait les différentes étapes de purification et refolding.

Soulignons que le but ultime de ces différentes études est de poursuivre la principale activité du laboratoire précité, à savoir l'étude de l'influence de la leptine sur la fécondité des brebis.

Ahilma R.S. *et al.* (1996)

Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting.

*Nature* **382**, 250-252

Ahima R.S., Flier J.S. (2000)

Adipose tissue as an endocrine organ.

*Trends in Endocrinology and Metabolism* **11**, 327-332

Almog B., Gold R., Tajima K., Dantes A., Salim K., Rubinstein M., Barkan D., Hombu Lessing J.B., Nevo N., Gertler A., Amsterdam A. (2001)

Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats.

*Molecular Cell Endocrinology* **25**, 179-191

Banks W.A., Kastin A.J., Huang W., Jaspan J.P., Maness L.M. (1996)

Leptin enters the brain by a saturable transport system independent of insulin.

*Peptides* **17**, 305-311

Baskin D.G., Schwartz M.W., Seeley R.J., Woods S.C., Porte D., Breiniger J.F., Jonak Z., Schaefer J., Krouse M., Burghardt C., Campfield L.A., Burn P., Kochan J.P. (1999)

Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus.

*The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **47**, 353-362

Bates S.H., Myers M.G. (2003)

The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function.

*Trends in Endocrinology and Metabolism* **14**, 447-452

Baumann H., Morella K.K., White D.W., Dembski M., Bailon P.S., Kim H., Lai C.F., Tartaglia L.A. (1996)

The full-length leptin receptor has signalling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors.

*National Academy of Sciences of the USA* **93**, 8374-8378

Bister J.L., Pirotte C., Wergifosse F., Vandermeir M.A., Paquay R. (2004a)

Plasma leptin level in relation with the body weight and its evolution in the ewe.

*Pflugers Arch-Eur J Physiol* **447**, R5-12

Bister J.L., Wergifosse F., Pirotte C., Pirot P., Paquay R. (2004b)

Leptin and fecundity in the ewe.

*Abstracts, 15<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil, ICAR 2004* vol. **2**, 316

Bjorbaek C., Uotani S., da Silva B., Fliers J.S. (1997)

Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor.

*The Journal of Biological Chemistry* **272**, 32686-32695

Bjorbaek C., El-Haschimi K., Frantz J.D., Flier J.S. (1999)

The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance.

*The Journal of Biological Chemistry* **274**, 30059-30095

- Bradley R.L., Cleveland K.A., Cheatham B. 2001  
The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways.  
*Reprod. Nutr. Dev.* **38**, 489-498
- Brann D.W., Wade M.F., Dhandapani K.M., Mahesh V.B., Buchanan C.D. (2002)  
Leptin and reproduction.  
*Steroids* **67**, 95-104
- Brooks-Asplund E.M., Tupper C.E., Daun J.M., Kennedy W.L., Cannon J.G. (2004)  
Determinants of plasma leptin concentration in postmenopausal women.  
*Mechanisms of Ageing and Development* **125**, 117-119
- Brown W.B., Forbes J.M., Goodall E.D., Kay R.N., Simpson A.M. (1979)  
Effects of photoperiod on food intake, sexual condition and hormone concentrations in stags and rams.  
*J. Physiol.* **296**, 58-59
- Burguera B., Couce M.E. (2001)  
Leptin access into the brain : a saturated transport mechanism in obesity.  
*Physiology and Behaviour* **74**, 717-720
- Caprio M., Isidori A.M., Carta A.R., Moretti C., Dufau M.L., Fabbri A. (1999)  
Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells.  
*Endocrinology* **140**, 4939-4947
- Caprio M., Fabbrini E., Isidori A.M., Aversa A., Fabbri A. (2001)  
Leptin in reproduction.  
*Trends in Endocrinology and Metabolism* **12**, 65-72
- Carvaleira J.B., Siloto R.M., Ignacchitti I., Brenelli S.L., Carvalho C.R., Leite A., Velloso L.A., Gontijo J.A., Saad M.J. (2001)  
Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus.  
*FEBS Lett.* **500**, 119-124
- Chehab F.F. *et al.* (1996)  
Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with human recombinant leptin.  
*Nat. Genet.* **12**, 318-320
- Chehab F.F. (1997)  
The reproductive side of leptin.  
*Nat. Med.* **3**, 952-953
- Chilliard Y., Bocquier F., Doreau M. (1998)  
Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction.  
*Reprod. Nutr. Dev.* **38**(2), 131-152

- Chilliard Y., Bocquier F., Delavaud C., Faulconnier Y., Bonnet M., Guerre-Millo M., Martin P., Ferlay A. (1999)  
Leptin in ruminants: physiologies and nutritionnels factors of variation.  
*INRA Animal Productions* **12**, 225-237
- Clement L., Cruciani-Guglielmacci C., Magnan C., Vincent M., Douared L., Orosco M., Assimacopoulos-Jeannet F., Penicaud L., Ktorza A. (2002)  
Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats.  
*Pflugers Arch.* **445**, 75-80
- Colditz G.A. (1992)  
Economic costs of obesity.  
*American Journal of Clinical Nutrition* **55**, 503S-507S
- Coleman D.L. (1978)  
Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice.  
*Diabetologia* **14**, 141-148
- Dyer C.J., Simmons J.M., Matteri R.L., Keisler D.H. (1997)  
CDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor, and NPY-Y2 receptor.  
*Domestic Animal endocrinology* **14**, 295-303
- Dotsch J. *et al.* (1999)  
Leptin and neuropeptide Y gene expression in human placenta: ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 2755-2758
- Ducy P., Amling M., Takeda S., Priemel M., Schilling A., Beil F. (2000)  
Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass.  
*Cell* **100**, 197-207
- Felson D.T., Zhang Y., Hannan M.T., Anderson J.J. (1993)  
Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women.  
*J. Bone Miner. Res.* **8**, 567-573
- Finn P.D. *et al.* (1998)  
The stimularity effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey.  
*Endocrinology* **139**, 4652-4662
- Friedman J.M., Halaas J.L. (1998)  
Leptin and the regulation of body weight in mammals.  
*Nature* **395**, 763-769
- Geisthovel F., Jochmann N., Widjaja Adj, Horn R., Brabant G. (2004)  
Serum pattern of circulating free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in the physiological menstrual cycle.  
*Fertility and sterility* **81**, 398-402

- Gerozissis K. (2004)  
Brain insulin and feeding: a bi-directional communication.  
*European Journal of Pharmacology* **490**, 59-70
- Gertler A., Simmons J., Keisler D.H. (1998)  
Large-scale preparation of biologically active recombinant ovine obese protein (leptin).  
*FEBS Letters* **422**, 137-140
- Guo K.Y., Halo P., Leibel R.L., Zhang Y. (2004)  
Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocytes size in anatomically distinct fat depots in mice.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*
- Gura T. (1997)  
Obesity sheds its secrets.  
*Science (Wash DC)* **275**, 751-753
- Hale C.S., Herring W.O., Johnson G.S., Shibuya H., Lubhan D.B., Keisler D.H. (1998)  
Evaluation of the leptin gene as a possible marker of carcass traits in Angus cattle.  
*Animal Sciences Departmental Report*
- Hamrick M.W., Pennington C., Newton D., Xie D., Isales C. (2004)  
Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine.  
*Bone* **34**, 376-383
- Harvey J., Hardy S.C., Irving A.J., Ashford M.L. (2000)  
*J. Physiology* **527**, 95-107
- Harvey J., Ashford M.L.J. (2003)  
Leptin in the CNS: much more than a satiety signal.  
*Neuropharmacology* **44**, 845-854
- Haugel-de Mouzon S., Lepercq J. (2001)  
Leptine placentaire et pathologies de la grossesse.  
*Gynécol Obstét Fertil* **29**, 534-537
- Havel P.J., Kasim-Karakas S., Mueller W., Johnson P.R., Gingerich R.L., Stern J.S. (1996)  
Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 4406-4413
- Havel P.J. (2001)  
Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis.  
*Society for the Experimental Biology and Medicine* **226**, 963-977

- Hileman S.M., Pierroz D.D., Masuzaki H., Bjorbaek C., El-Haschimi K., Banks W., Flier J.S. (2002)  
 Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity.  
*Endocrinology* **143**, 775-783
- Hoggard N. *et al.* (1997)  
 Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and *in situ* hybridization.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 383-387
- Houseknecht K.L., Baile C.A., Matteri R.L., Spurlock M.E. (1998)  
 The biology of leptin: a review.  
*Journal of Animal Sciences* **76**, 1405-1420
- Hummel K.P., Dickie M.M., Coleman D.L. (1966)  
*Science* **153**, 1127-1128
- Ingalls A.M., Dickie M.M., Coleman D.L. (1950)  
*J. Hered.* **41**, 317-318
- Iqbal J. *et al.* (2000)  
 Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes and gonadotropes in the ovine anterior pituitary.  
*Endocrinology* **141**, 1515-1520
- Isidori A.M. *et al.* (2000)  
 Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 1954-1962
- Isse N., Ogawa Y., Tamura N., Masuzaki H., Mori K., Okasaki T., Satoh N., Shigemoto M., Yoshimasa Y., Nishi S., Hosoda K., Inazawa J., Nakao K. (1995)  
 Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene.  
*The Journal of Biological Chemistry* **270**, 27728-27733
- Iwai H., Ohno Y., Aoki N. (2003)  
 The effect of leptin, TNF- $\alpha$ , and NO production on insulin resistance in Otsuka long-evans fatty rats.  
*Endocrine Journal* **50**, 673-680
- Jeong K.J., Lee S.Y. 1999  
 High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification.  
*Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3027-3032
- Ji S., Willis G.M., Scott R.R., Spurlock M.E. (1998)  
 Partial cloning and expression of the bovine leptin gene.  
*Animal Biotechnology* **9**, 1-14

- Jin L. *et al.* (2000)  
Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells.  
*Endocrinology* **141**, 333-339
- Karlsson C. *et al.* (1997)  
Expression of functional leptin receptors in the human ovary.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 4144-4148
- Kennedy G.C. (1953)  
The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat.  
*Proc. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **140**, 578-596
- Kile B.T., Schulman B.A., Alexander W.S., Nicola N.A., Martin H.M.E., Hilton D.J. (2002)  
The SOCS box: a tale of destruction and degradation.  
*Trends in Biochemical Sciences* **27**, 235-241
- Kitawaki L., Koshihara H., Ishihara H., Kusuki I., Tsukamoto K., Honjo H. (2000)  
Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 1946-1950
- Kline A.D., Becker G.W., Churgay L.M., Landen B.E., Martin D.K., Muth W.L., Rathnachalam R., Richardson J.M., Schoner B., Ulmer M., Hale J.E. (1997)  
Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR.  
*Federation of European Biochemical Societies, Letters* **407**, 239-242
- Kurrimbux D., Gaffen Z., Farrell C.L., Martin D., Thomas S.A. (2004)  
The involvement of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers in the distribution of leptin into and out of the rat brain.  
*Neuroscience* **123**, 527-536
- Laborde C., Chermadin P., Bigey C., Combarnous Y., Moulin G., Boze H. (2004)  
Overexpression of ovine leptin in *Pichia pastoris*: physiological yeast response to leptin production and characterization of the recombinant hormone.  
*Yeast* **21**, 249-263
- Lee G.H., Proenca R., Montez J.M., Carroll K.M., Darishzadeh J.G., Lee J.I., Friedman J.M. (1996)  
*Nature* **379**, 632-635
- Lee F-Y.J., Li Y., Yang E.K. (1998)  
Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient, obese mice.  
*Am. J. Physiol.* **276**, C386-C394
- Lembo G., Vecchione C., Fratta L., Marino G., Trimarco V., d'Amati G. (2000)  
Leptin induces direct vasodilation through endothelial mechanisms.  
*Diabetes* **49**, 293-297
- Loffreda S. Rai R., Yang S.Q. (1998)

Leptin regulates proinflammatory immune responses.  
*FASEB J.* **12**, 57-65

Madej T., Boguski M.S., Bryant S.H. (1995)  
Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine.  
*Federation of European Biochemical Societies* **373**, 13-18

Magni P. *et al.* (1999)  
Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons.  
*Endocrinology* **140**, 1581-1585

Mantzoros C. *et al.* (1997)  
Cerebrospinal fluid leptin in anorexia nervosa: correlation with nutritional status and potential role in resistance to weight gain.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2**, 1845-1851

Matsumura K., Tsuchihashi T., Fujii K., Iida M. (2003)  
Neural regulation of blood pressure by leptin and the related peptides.  
*Regulatory Peptides* **114**, 79-86

Mbayahaga J., Mandiki S.N.M., Bister J.L., Paquay R. (2004)  
Body weight, oestrous and ovarian activity in local Burundian ewes and goats after parturition in the dry season.  
*Anim. Reprod. Sc.* **51**, 289-300

McMinn J.E., Sindelar D.K., Havel P.J., Schwartz M.W. (2000)  
Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin.  
*Endocrinology* **141**, 4442-4448

Morgan P.J., Barrett P., Howell E., Helliwell R. (1994)  
Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance.  
*Neurochemistry International* **24**, 101-146

Morgan P.J. (2000)  
The Pars Tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion?  
*Journal of the Neuroendocrinology* **12**, 287-295

Morgan P.J., Ross A.W., Mercer J.G., Barrett P. (2003)  
Circadian and seasonal rhythms: Photoperiodic programming of body weight through the neuroendocrine hypothalamus.  
*Journal of Endocrinology* **177**, 27-34

Moschos S., Chan J.L., Mantzoros C.S. (2002)  
Leptin and reproduction: a review.  
*Fertility and sterility* **77**, 433-441



- Mounzih K. *et al.* (1997)  
Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males.  
*Endocrinology* **138**, 1190-1193
- Mueller W.M., Gregoire F.M., Stanhope K.L., Mobbs C.V., Mizuno T.M., Warden C.H., Sterns J.S., Havel P.J. (1998)  
Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes.  
*Endocrinology* **139**, 551-558
- Najib S., Sanchez-Margalet V. (2002)  
Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway.  
*Cell Immunol.* **220**, 143-149
- Newby D., Gertler A., Vernon R.G. (2001)  
Effects of recombinant ovine leptin on in vitro lipolysis and lipogenesis in subcutaneous adipose tissue from lactating and nonlactating sheep.  
*Journal of Animal Sciences* **79**, 445-452
- Paquay R., Bister J.L., Wergifosse F., Pirotte C. (2004)  
Effect of body condition changes on reproductive performances in ewes.  
*11<sup>e</sup> Rencontres Recherches Ruminants Paris*
- Parent A.S., Lebrethon M.C., Gerard A., Vandersmissen E., Bourguignon J.P. (2000)  
Leptin effects on pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from the adult rat hypothalamus and interaction with cocaine and amphetamine regulated transcript peptide and neuropeptide Y.  
*Regul. Pept.* **92**, 17-24
- Pinilla L. *et al.* (1999)  
Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats.  
*Eur. J. Endocrinol.* **140**, 468-473
- Ramsay T.G., Yan X., Morrison C. (1998)  
The obesity gene in Swine: sequence and expression of porcine leptin.  
*American Society of Animal Science* **76**, 484-490
- Rasmussen D.D., Boldt B.M., Wilkinson C.W., Yellon S.M., Matsumoto A.M. (1999)  
Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels.  
*Endocrinology* **140**, 1009-1012
- Reseland J., Gordeladze J. (2002)  
Role of leptin in bone growth: central player or peripheral supporter?  
*FEBS Lett.* **528**, 40-42
- Roh S.G., Nie G.Y., Loneragan K., Gertler A., Chen C. (2001)  
Direct modification of somatotrope function by long-term leptin treatment of primary cultured ovine pituitary cells.  
*Endocrinology* **142**, 5167-5171

- Saltiel AR, Kahn C.R. (2001)  
Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.  
*Nature* **414**, 799-806
- Sanchez-Margalet V., Martin-Romero C., Santos-Alvarez J., Goberna R., Najib S., Gonzalez-Yanez C. (2003)  
Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action.  
*Clinical and experimental Immunology* **133**, 11-19
- Sasaki N., Shibata H., Honjoh T., Kimura K., Saito M., Ohishi I. (2001)  
CDNA cloning of feline leptin and its mRNA expression in adipose tissue.  
*Journal of Veterinary and Medicine Sciences* **63**, 115-1120
- Sayed-Ahmed A., Elmorsy S.E., Rudas P., Bartha T. (2003)  
Partial cloning and localization of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the Egyptian water buffalo.  
*Domestic Animal Endocrinology* **25**, 303-314
- Schwartz M.W., Seeley J., Campfield L.A., Burn P., Baskin D.G. (1996)  
Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus.  
*The American Society for Clinical Investigations* **98**, 1101-1106
- Shek E.W., Brands M.W., Hall J.E. (1998)  
Chronic leptin infusion increases arterial pressure.  
*Hypertension* **31**, 409-414
- Shimomura I., Funahashi T., Takahashi M., Maeda K., Kotani K., Nakamura T., Yamashita S., Miura M., Fukuda Y., Takemura K., Tokunaga K., Matsuzawa Y. (1996)  
Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity.  
*Nat. Med.* **2**, 800-803
- Sivan E. *et al.* (1998)  
Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.* **179**, 1128-1132
- Song C.K., Bartness T.J. (2001)  
CNS sympathetic outflow neurons to white fat that express MEL receptors may mediate seasonal adiposity.  
*American Journal of Physiology* **281**, R666-R672
- Spicer J., Francisco C.C. (1998)  
Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis.  
*Biol. Reprod.* **58**, 207-212
- Spicer J. (2001)  
Leptin: a possible signal affecting reproduction.  
*Domestic Animal Endocrinology* **21**, 251-270

Stephens T.W., Basinski M., Bristow P.K., Blue-Valleskey J.M., Burgett S.G., Craft L., Hale J., Hoffman J., Hsiung H.M., Kriauciunas A., Mackellar W., Rosteck P.R., Schoner B., Smith D., Tinsley F.C., Zhang X.Y., Heiman M. (1995)

The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product.  
*Nature* **377**, 530-532

Steppan C., Crawford T., Chidsey-Frink K., Ke H., Swick A. (2000)  
Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice.

*Regul. Pept.* **92**, 73-78

Sweeney G. (2002)

Leptin signalling.

*Cellular signalling* **14**, 655-663

Szanto I., Kahn C.R. (1999)

Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line.  
*National Academy of Sciences of the USA* **97**, 2355-2360

Tannenbaum G.S., Gurd W., Lapointe M. (1998)

Leptin is a potent stimulator of bone spontaneous pulsatile growth hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone.

*Endocrinology* **139**, 3871-3875

Taouis M., Dridi S., Benomar Y., Raver N., Rideau N., Picard M., Williams J., Gertler A. (2001)

Chicken leptin: properties and actions.

*Domestic Animal Endocrinology* **21**, 319-327

Tartaglia L.A., Dempski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards C.J., Campfield L.A., Clark F.T., Deeds J., Muir C., Sanker S., Moriarty A., Moore K.J., Smutko J.S., Mays G.G., Woolfe E.A., Monroe C.A., Tepper R.T. (1995)

Identification and expression cloning of a leptin receptor, Ob-R.

*Cell* **83**, 1263-1271

Tartaglia L.A. (1997)

The leptin receptor.

*The Journal of Biological Chemistry* **272**, 6093-6096

Thomas T., Gori F., Khosla S., Jensen M., Burguera B., Riggs B. (1999)

Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes.

*Endocrinology* **140**, 1630-1638

Thompson D.B., Ravussin E., Bennett P.H., Bogardus C. (1997)

Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians.

*Human Molecular Genetic* **6**, 675-679

Tschöp M. (2000)

*Nature* **407**, 908-913

- Varnerin J.P., Smith T., Rosenblum C.I., Vongs A., Murphy B.A., Nunes C., Mellin T.N., King J.J., Burgess B.W., Junker B., Chou M., Hey P., Frazier E., MacIntyre D.E., Van der Ploeg L.H.T., Tota M.R. (1998)  
Production of leptin in *E. coli*: a comparison of methods.  
*Protein expression and purification* **14**, 335-342
- Vernon R.G., Barber M.C., Travers M.T. (1999)  
Present and future studies on lipogenesis in animals and human subjects.  
*Proc. Nutr. Soc.* **58**, 541-549
- Wauters M. *et al.* (2000)  
Human leptin: from an adipocytes hormone to an endocrine mediator.  
*Eur. J. Endocrinol.* **143**, 293-311
- Wergifosse F., Bister J.L., Pirotte C., Pirot P., Paquay R. (2004a)  
Nutrition, body condition and leptin in the ewe.  
*5th international congress on Farm Animal Endocrinology, EAAP, Budapest, Hungaria*
- Wergifosse F., Bister J.L., Pirotte C., Pirot P., Paquay R. (2004b)  
Leptin and reproduction in the ewe.  
*5th international congress on Farm Animal Endocrinology, EAAP, Budapest, Hungaria*
- White D.W., Tartaglia L.A. (1996)  
Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor.  
*Cytokine and Growth Factor Reviews* **7**, 303-309
- White D.W., Kuropatwinski K., Devos R., Baumann H., Tartaglia L.A. (1997)  
*J. Biol. Chem.* **272**, 4065-4071
- Withers D.J. *et al.* (1998)  
Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice.  
*Nature* **391**, 900-904
- Yamashita T., Murakami T., Otani S., Kuwajima M., Shima K. (1998)  
Leptin receptor signal transduction: Ob-Ra and Ob-Rb of fa type.  
*Biochemical and Biophysical Research communications* **246**, 752-759
- Yu W.H., Kimura M., Walczewska A., Karanth S., McCann S.M. (1997)  
Role of leptin in hypothalamic-pituitary function.  
*National Academy of Sciences of the USA, Physiology* **94**, 1023-1028
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. (1994)  
Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.  
*Nature* **372**, 425-432
- Zhang F., Basinski M.B., Beals J.M., Briggs S.L., Churgay L.M., Clawson D.K., DiMarchi R.D., Furman T.C., Hale J.E., Hsiung H.M., Schoner B.E., Smith D.P., Zhang X.Y., Wery J.P., Schevitz R.W. (1997)  
Crystal structure of the obese protein leptin-E100.  
*Nature* **387**, 206-209

Zhao A.Z., Shinohara M.M., Huang D., Shimizu M., Eldar-Finkelman H., Krebs E.G., Beavo J.A., Bornfeldt K.A. (2000)  
Leptin induces insulin-like signalling that antagonises cAMP elevation by glucagons in hepatocytes.  
*Journal of Biological Chemistry* **275**, 11348-11354